



# Optimisation de la conservation des cosmétiques : impact de la formulation, recherche de nouveaux conservateurs naturels, encapsulation

Audrey Kerdudo

## ► To cite this version:

Audrey Kerdudo. Optimisation de la conservation des cosmétiques : impact de la formulation, recherche de nouveaux conservateurs naturels, encapsulation. Autre. Université Nice Sophia Antipolis, 2014. Français. NNT : 2014NICE4050 . tel-01126964

**HAL Id: tel-01126964**

**<https://theses.hal.science/tel-01126964>**

Submitted on 6 Mar 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# UNIVERSITE NICE SOPHIA-ANTIPOLIS - UFR SCIENCES

Ecole Doctorale Sciences Fondamentale et Appliquées  
INSTITUT DE CHIMIE DE NICE

## THESE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE NICE – SOPHIA ANTIPOLIS

DISCIPLINE : **CHIMIE**

présentée et soutenue par

**Audrey KERDUDO**

## OPTIMISATION DE LA CONSERVATION DES COSMETIQUES

–

## IMPACT DE LA FORMULATION, RECHERCHE DE NOUVEAUX CONSERVATEURS NATURELS, ENCAPSULATION

Thèse co-dirigée par Pr. Xavier FERNANDEZ et Pr. Chrystel FAURE  
soutenue le 10 juillet 2014

### JURY

|                              |  |                               |
|------------------------------|--|-------------------------------|
| <b>Jean-Marie AUBRY</b>      | <b>Professeur à l'ENSCL</b>  | <i>Rapporteur</i>             |
| <b>Philippe PICCERELLE</b>   | <b>Professeur – Université Aix Marseille</b>                                   | <i>Rapporteur</i>             |
| <b>Christophe DI GIORGIO</b> | <b>Maître de conférences – Université<br/>Nice Sophia Antipolis</b>            | <i>Examineur</i>              |
| <b>Alexandre DINGAS</b>      | <b>Docteur en Chimie – Directeur des<br/>laboratoires SO.F.I.A Cosmétiques</b> | <i>Examineur</i>              |
| <b>Xavier FERNANDEZ</b>      | <b>Professeur – Université Nice Sophia<br/>Antipolis</b>                       | <i>Directeur de thèse</i>     |
| <b>Chrystel FAURE</b>        | <b>Professeur à l'IPB</b>  | <i>Co-directrice de thèse</i> |



## REMERCIEMENTS

*Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, Xavier Fernandez, professeur à l'Institut de Chimie de Nice (ICN) pour m'avoir accueillie dans son équipe et m'avoir fait l'honneur de diriger ce travail. Je lui suis profondément reconnaissante pour sa patience, son soutien, sa grande confiance et l'autonomie qu'il m'a généreusement offerts tout au long de ces années au travers de nos précieux échanges, dans les moments de doutes et les périodes difficiles.*

*Je remercie également le docteur Alexandre Dingas, docteur en Chimie et directeur des laboratoires SO.F.I.A Cosmétiques pour m'avoir accueillie au sein de son entreprise dans le cadre de cette thèse CIFRE et pour m'avoir donné les moyens d'avancer et compléter mon niveau de connaissances et surtout pour son implication personnelle dans l'initiation de ce projet ainsi que pour nos réunions régulières pendant ces trois années.*

*Mes remerciements les plus sincères à Chrystel Faure, professeur au laboratoire de Chimie et Biologie des Membranes et Nano-objets, pour avoir accepté de co-diriger ce travail et pour m'avoir conseillée, aidée et soutenue tant dans le travail et l'avancement de la thèse que moralement.*

*Merci également à Elisabet Duñach de m'avoir accueillie à l'ICN pour ces trois années de thèse.*

*Je suis très reconnaissante à Jean-Marie Aubry et Philippe Piccerelle qui me font l'honneur de juger ce travail en qualité de rapporteurs. De même, je remercie très sincèrement Christophe Di Giorgio et Alexandre Dingas pour avoir accepté d'être examinateurs de cette thèse.*

*Un grand merci à tous les acteurs du projet NATUBAVAL. Merci aux organismes financeurs de ce projet : OSEO et la région PACA notamment. Mes sincères remerciements aux partenaires et porteurs du projet : SO.F.I.A. Cosmétiques, l'ICN, Naturex, le Pole PASS. Merci à Florence Merck pour les résultats générés en parallèle et nécessaires à mes travaux de thèse. Je remercie également Claude Monin (Acphytaroma) pour la réalisation des nombreux extraits de plantes évalués durant tout le projet. Merci à Jean-Paul Gherardi, de l'association Biophyto, d'avoir généreusement donné de son temps et de son énergie pour aller cueillir les plantes tout au long de ses années. Je remercie Yohan Rolland pour ses judicieux conseils sur l'optimisation des extraits et son approche industrielle. Merci à Alexandre Dingas pour ses idées concernant l'approche cosmétique. Merci également à Francis Hadji-Minaglou pour ses conseils au démarrage de cette thèse.*

*Merci au personnel des laboratoires SO.F.I.A. Cosmétiques pour le support et la collaboration. Merci à Corinne et Anne-Laure pour les conseils techniques. Merci à Charlotte, Marylise, Mélanie et Coco pour le soutien apporté.*

Merci à la dynamique équipe de la SATT pour leur précieuse (et très efficace !) aide dans le cadre de la valorisation des résultats.

Je remercie également Fabien Fontaine-Vive pour son aide et ses explications en modélisation moléculaire. Merci à Jérôme Golebiowski pour son apport dans ces discussions.

Je souhaite sincèrement remercier Lise et Rémi 'nouille' pour leur précieuse aide, en particulier en HPLC. Merci pour votre patience et pour les nombreuses discussions riches d'idées. Mais surtout, un grand merci pour les moments passés ensemble à rire, échanger et à nouer des liens.

Je n'oublie pas de remercier Emilie, Claire 'Fauve', Claire '2', Julien, Coni, Carole pour tous ces moments passés et partagés durant ces longues ou très longues journées. Merci pour le soutien, l'affection, les rires, les échanges. Merci aux stagiaires également, en particulier Florence Uvernet.

Et enfin, un très grand merci à Tiên et Alex. Vous m'avez apporté soutien moral, affectif, encouragements. Nous avons partagé rires et larmes. Très simplement, vous avez été là. Tiên, merci pour ton aide en HPTLC et le temps passé et dépensé pour le développement des méthodes. Merci aussi pour ta patience face à mes questions... Alex, merci pour ton aide ! Je n'oublie pas les heures que tu as consacrées à m'aider quand les manips n'en finissaient plus ! Je n'oublie pas non plus l'oreille attentive et soucieuse que tu m'as prêtée.

Merci à tous ceux qui, par leur présence, leur sourire, leurs propos au labo ou dans le bâtiment, m'auront apporté quelque encouragement direct ou indirect pendant toutes ces années de thèse.

Ma plus grande reconnaissance à mes amies sans qui ces années n'auraient très certainement pas été les mêmes. Merci à Corinn, Céline, Romy, Dina pour les longues discussions, les précieux encouragements. Merci de m'avoir écoutée, entendue, soutenue, fortifiée et comprise. Vous avez largement contribué à ma persévérance. Merci de vos amitiés qui me sont chères.

Enfin, je terminerais par mes plus chers remerciements à ma famille, mes parents, Juju, Mimi, Bryan. Vous êtes chers à mon cœur.

Avec toute mon affection,

Audrey



## LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES UTILISÉS

|                            |  |
|----------------------------|--|
| <b>ASES</b>                | Système d'extraction de solvant d'aérosols ( <i>Aerosol Solvent Extraction System</i> )  |
| <b>BDIH</b>                | Association Fédérale des Entreprises Commerciales et Industrielles pour les médicaments, les produits diététiques, les compléments alimentaires et les soins corporels. ( <i>Bundesverband der Industrie – eine Handelsunternehmen für Arzneimittel, Reformwaren, Nahrungsergänzungsmittel und kosmetische Mittel e.V.</i> ) |
| <b>CFU (UFC)</b>           | Unité Formant Colonie  |
| <b>COSMO-Standard</b>      | <i>Cosmetic Organic Standard</i>   |
| <b>CMC</b>                 | Concentration Micellaire Critique  |
| <b>CMC</b>                 | Carboxymethylcellulose   |
| <b>CMI</b>                 | Concentration Minimale d'Inhibition  |
| <b>Cryo-MEB</b>            | Cryo-Microscopie Electronique à Balayage   |
| <b>DAD</b>                 | Barrettes de diodes ( <i>Diode-array detector</i> )  |
| <b>DO</b>                  | Densité Optique  |
| <b>FS</b>                  | Fluide Supercritique   |
| <b>HPLC</b>                | Chromatographie Liquide Haute Performance ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )  |
| <b>HPMC</b>                | Hydroxypropylmethylcellulose   |
| <b>HPTLC</b>               | Chromatographie sur Couche Mince Haute Performance ( <i>High performance thin layer chromatography</i> )   |
| <b>ICEA</b>                | <i>Istituto Certificazione Etica e Ambientale</i>  |
| <b>INCI</b>                | Nomenclature Internationale des Ingrédients Cosmétiques ( <i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredients</i> )  |
| <b>LysoPC</b>              | Lysophosphatidylcholine  |
| <b>Na<sub>2</sub>-EDTA</b> | Acide éthylène diamine tétra acétique disodium   |
| <b>PC</b>                  | Phosphatidylcholine  |
| <b>PCA</b>                 | Précipitation par utilisation d'un antisolvant fluide compressé ( <i>Precipitation with a Compressed fluid Antisolvent</i> )   |
| <b>PDA</b>                 | <i>Potato Dextrose Agar</i>  |
| <b>PE</b>                  | Polyéthylène   |
| <b>PLA</b>                 | Acide Polylactique   |
| <b>PLGA</b>                | Acide Poly(lactide-co-glycolide)   |
| <b>PP</b>                  | Polypropylène  |
| <b>PS</b>                  | Polystyrène  |

|             |  |
|-------------|--|
| <b>PVC</b>  | Chlorure de Polyvinyle   |
| <b>RESS</b> | Expansion rapide de solutions supercritiques ( <i>Rapid Expansion of Supercritical Solutions</i> ) |
| <b>SAB</b>  | Sabouraud  |
| <b>SEC</b>  | Chromatographie d'Exclusion de taille ( <i>Size Exclusion Chromatographie</i> )                    |
| <b>SPE</b>  | Extraction sur Phase Solide ( <i>Solid Phase Extraction</i> )                                      |
| <b>TSA</b>  | Tripcase soja Agar ( <i>Tryptic Soy Agar</i> )   |
| <b>TSB</b>  | Tripcase Soja Bouillon ( <i>Tryptic Soy Broth</i> )  |
| <b>UV</b>   | Ultraviolet  |



# TABLE DES MATIERES

|   |           |
|---|-----------|
| INTRODUCTION GENERALE.....                                | 12        |
| <b>CHAPITRE I RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>           | <b>15</b> |
| INTRODUCTION.....   | 16        |
| PARTIE I : LES COSMETIQUES.....                           | 17        |
| 1. Qu'est-ce qu'un produit cosmétique ?.....              | 18        |
| 1.1 Définition.....                                       | 18        |
| 1.2 Composition.....                                      | 18        |
| 1.2.1 Actifs.....   | 18        |
| 1.2.2 Excipients.....                                     | 18        |
| 1.2.3 Additifs.....                                       | 19        |
| 2 Conservation et conservateurs.....                      | 19        |
| 2.1 Qu'est-ce qu'un conservateur ?.....                   | 19        |
| 2.2 Pourquoi la conservation ?.....                       | 19        |
| 2.3 Réglementation.....                                   | 20        |
| 2.3.1 Directive européenne.....                           | 20        |
| 2.3.2 Cosmetics Organic Standard (COSMOS-standard).....   | 21        |
| 2.3.2.1 Les cosmétiques biologiques.....                  | 21        |
| 2.3.2.2 COSMOS-standard.....                              | 21        |
| 2.4 Les conservateurs de synthèse.....                    | 23        |
| 2.4.1 Conservateurs autorisés et modes d'actions.....     | 23        |
| 2.4.2 Le cas des parabènes.....                           | 24        |
| 2.5 Extraits naturels et propriétés antimicrobiennes..... | 26        |
| 2.5.1 Définition.....                                     | 26        |
| 2.5.2 Huiles essentielles.....                            | 26        |
| 2.5.2.1 Mode d'obtention.....                             | 26        |
| 2.5.2.2 Mode d'action.....                                | 27        |
| 2.5.2.3 Contraintes de formulation.....                   | 27        |
| 2.5.3 Extraits naturels.....                              | 27        |
| 2.5.3.1 Modes d'obtention.....                            | 27        |
| 2.5.3.2 Avantages.....                                    | 28        |
| 2.5.3.3 Contraintes d'utilisation.....                    | 28        |
| 2.5.4 Huiles végétales.....                               | 31        |
| 3 Les alternatives à l'utilisation des conservateurs..... | 31        |
| 3.1 Alternatives de formulation.....                      | 31        |
| 3.1.1 Activité de l'eau.....                              | 31        |
| 3.1.1.1 Définition.....                                   | 31        |
| 3.1.1.2 Activité de l'eau et conservation.....            | 32        |
| 3.1.1.3 Facteurs ayant une influence sur l'aw.....        | 33        |
| 3.1.1.4 Autres systèmes de conservation.....              | 40        |
| 3.1.2 De la fabrication au packaging.....                 | 42        |

|   |   |           |
|---|---|-----------|
| 3.1.2.1   | BPF .....   | 42        |
| 3.1.2.2   | Packaging .....   | 42        |
| 3.1.2.3   | Matériaux .....   | 43        |
| 4   | Les antioxydants.....   | 44        |
| 5   | Microbiologie .....   | 46        |
| 6   | Conclusion.....   | 49        |
| PARTIE II : ENCAPSULATION .....   |   | 50        |
| 1.  | L'encapsulation en cosmétique .....   | 53        |
| 2.  | Procédés classiques d'encapsulation.....  | 53        |
| 2.1.  | Procédés chimiques.....   | 53        |
| 2.1.1.  | <i>La polymérisation.....</i>   | 53        |
| 2.2.  | Procédés mécaniques.....  | 54        |
| 2.2.1.  | <i>Le spray drying ou séchage par atomisation .....</i>   | 54        |
| 2.2.2.  | <i>Le spray cooling ou prilling (gélification/congélation de gouttes).....</i>                            | 54        |
| 2.2.3.  | <i>Le lit d'air fluidisé.....</i>   | 55        |
| 2.2.4.  | <i>L'extrusion .....</i>  | 55        |
| 2.2.5.  | <i>Rapid Expansion of Supercritical Solutions (RESS) et Aerosol Solvent Extraction System (ASES).....</i> | 56        |
| 2.2.6.  | <i>Rapid Expansion of Supercritical Solutions (RESS).....</i>   | 56        |
| 2.2.7.  | <i>Aerosol Solvent Extraction System (ASES) .....</i>   | 57        |
| 2.3.  | Procédés physico-chimiques.....   | 57        |
| 2.3.1.  | <i>Evaporation/extraction de solvant.....</i>   | 57        |
| 2.3.1.1.  | <i>Emulsion simple (H/H ou H/E)) .....</i>  | 57        |
| 2.3.1.2.  | <i>Emulsion double (E/H/E) .....</i>  | 58        |
| 2.3.2.  | <i>La gélation ionotropique .....</i>   | 58        |
| 2.3.3.  | <i>La coacervation.....</i>   | 59        |
| 2.3.3.1.  | <i>La coacervation simple.....</i>  | 59        |
| 2.3.3.2.  | <i>La coacervation complexe .....</i>   | 59        |
| 2.3.4.  | <i>Les émulsions.....</i>   | 60        |
| 2.3.5.  | <i>Les systèmes vésiculaires .....</i>  | 61        |
| 2.3.5.1.  | <i>Les liposomes .....</i>  | 61        |
| 2.3.5.2.  | <i>Les vésicules multilamellaires types oignons.....</i>  | 63        |
| 3.  | Conclusion.....   | 66        |
| CONCLUSION .....  |   | 71        |
| <b>CHAPITRE II RESULTATS ET DISCUSSION FORMULATION COSMETIQUE .....</b>             |   | <b>72</b> |
| INTRODUCTION.....   |   | 73        |
| PARTIE I : OPTIMISATION DE FORMULATIONS PAR DIMINUTION DE L'ACTIVITE DE L'EAU ..... |   | 73        |
| 1.  | Formules témoins .....  | 73        |
| 2.  | Impact de la glycérine et de glycols sur l'a <sub>w</sub> .....   | 77        |
| 2.1   | Influence du protocole de formulation .....   | 82        |
| 2.2   | Application aux formules.....   | 84        |
| 3.  | Challenge test.....   | 87        |
| 4.  | Impact d'agents rhéologiques sur l'a <sub>w</sub> .....   | 90        |

|  |            |
|--|------------|
| 5. Impact du pH sur l' $a_w$ .....   | 91         |
| PARTIE II : EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES EXTRAITS DE PLANTES SELECTIONNEES DANS LE CADRE DU PROJET ..... | 93         |
| 1. Activité antimicrobienne des extraits végétaux .....  | 94         |
| 1.1 Activité antimicrobienne des extraits bruts .....  | 94         |
| 1.2 Optimisation de l'extrait de plante A : support solide et décoloration .....   | 96         |
| 1.2.1 Décoloration sur charbon actif.....  | 98         |
| 1.2.2 Solubilisation des extraits.....   | 99         |
| 1.2.3 Décoloration par distillation moléculaire.....   | 101        |
| 1.3 Activité antimicrobienne de l'extrait de plante A enrichi en actif .....   | 103        |
| 1.4 Activité antimicrobienne de l'extrait de plante A sur support liquide .....  | 104        |
| 1.5 Activité antimicrobienne de l'extrait de plante A associé à des agents de chélation.....                             | 108        |
| 2. Formulation cosmétique et challenge test.....   | 110        |
| 2.1 Analyse des challenges test.....   | 110        |
| 2.1.1 Extraits de plante A sur supports dans la crème témoin.....  | 110        |
| 2.1.2 Extraits de plante A sur supports dans la crème optimisée en $a_w$ .....   | 116        |
| 2.1.3 Extraits de plante A sur supports et plante C1 dans la crème témoin.....   | 118        |
| 2.1.4 Conclusion .....   | 120        |
| 3. Dosage de l'actif de la plante A en formulation cosmétique.....   | 120        |
| 3.1 Développement de la méthode.....   | 120        |
| 3.2 Dosage de l'actif.....   | 125        |
| 3.3 Conclusion.....  | 126        |
| PARTIE III : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....   | 127        |
| <b>CHAPITRE III RESULTATS ET DISCUSSION ENCAPSULATION .....</b>  | <b>128</b> |
| INTRODUCTION.....  | 129        |
| PARTIE I : DEVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UN SYSTEME D'ENCAPSULATION .....  | 133        |
| 1. Validation d'un système d'encapsulation.....  | 133        |
| 1.1 Emulsions multiples .....  | 133        |
| 1.2 Gélation ionotropique .....  | 133        |
| 1.2.1 Démarche 1 .....   | 133        |
| 1.2.2 Démarche 2 .....   | 134        |
| 1.2.3 Conclusion et perspectives.....  | 134        |
| 1.3 Coarcervation complexe : Gomme arabique/lécithines .....   | 135        |
| 1.4 Vésicules multilamellaires : oignons.....  | 136        |
| 1.5 Conclusion.....  | 137        |
| 2. Développement du système d'encapsulation retenu : vésicules multilamellaires type oignons                             | 138        |
| 2.1 Choix des analytes .....   | 138        |
| PARTIE II : DEVELOPPEMENT ET OPTIMISATION DES OIGNONS EN FONCTION DES PHOSPHOLIPIDES .....                               | 139        |
| 1. Matières premières .....  | 139        |
| 1.1 Microscopie .....  | 139        |
| 1.2 Granulométrie .....  | 140        |

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 1.3   | Nanoparticules et réglementation .....   | 141 |
| 2.    | Rendements d'encapsulation .....   | 142 |
| 2.1   | Comparaison des méthodes de séparation .....   | 142 |
| 2.1.1 | <i>Ultracentrifugation – Chromatographie d'exclusion stérique</i> .....                          | 142 |
| 2.2   | Phénomène d'adsorption et calcul des rendements d'encapsulation .....                            | 145 |
| 2.3   | Rendements d'encapsulation des oignons .....   | 147 |
| 3.    | Substitution du phospholipide .....  | 148 |
| 3.1   | Microscopie .....  | 148 |
| 3.2   | Granulométrie .....  | 148 |
| 3.3   | Rendements d'encapsulation .....   | 149 |
|       | PARTIE III : OPTIMISATION DES OIGNONS .....  | 150 |
| 1.    | Rendements d'encapsulation en fonction des concentrations en analytes .....                      | 151 |
| 2.    | Rendements d'encapsulation en fonction de la composition du système .....                        | 154 |
| 2.1   | Rendements d'encapsulation .....   | 154 |
| 2.2   | Définition de la composition optimale – Modèle mathématique .....                                | 157 |
| 2.2.1 | <i>Domaine diphasique : échantillon B</i> .....  | 157 |
| 2.2.2 | <i>Domaine monophasique : échantillon C</i> .....  | 158 |
| 2.2.3 | <i>Limite entre les deux domaines : échantillon A</i> .....                                      | 159 |
| 2.2.4 | <i>Composition optimale</i> .....  | 159 |
| 3.    | Rendements d'encapsulation en fonction de la concentration en Rutine – Modèle mathématique ..... | 160 |
| 3.1   | Rendements d'encapsulation .....   | 160 |
| 3.2   | Définition de la concentration optimale – Modèle mathématique .....                              | 161 |
| 3.3   | Composition optimale .....   | 163 |
| 4.    | Conclusion .....   | 164 |
|       | PARTIE IV : CARACTERISTIQUES DU SYSTEME OPTIMISE .....   | 164 |
| 1.    | Microscopie .....  | 164 |
| 2.    | Granulométrie .....  | 165 |
| 3.    | Cinétique de relargage .....   | 166 |
| 4.    | Test d'activité antioxydante .....   | 169 |
|       | PARTIE V : CAPSULES OPTIMISEES EN MILIEUX FORMULES .....   | 170 |
| 1.    | Formulation des capsules en produits cosmétiques .....   | 170 |
| 2.    | Fractionnement par exclusion stérique .....  | 171 |
| 3.    | Dosage de la rutine encapsulée par HPTLC .....   | 172 |
| 4.    | Dosage de la rutine encapsulée dans une lotion .....   | 173 |
| 4.1   | Capsules dans la lotion tonique témoin .....   | 173 |
| 4.2   | Capsules dans la lotion tonique modifiée .....   | 173 |
| 5.    | Dosage de la rutine encapsulée dans une crème .....  | 174 |
| 6.    | Conclusion .....   | 175 |
|       | PARTIE VI : APPLICATION DU SYSTEME A D'AUTRES MOLECULES .....                                    | 175 |

|   |            |
|---|------------|
| 1. Acides benzoïque et salicylique .....  | 176        |
| 1.1 Microscopie .....   | 177        |
| 1.2 Rendements d'encapsulation.....   | 178        |
| 2. MethylIsothiazolinone et MethylChloroIzothiazolinone (MI/MCI) .....                  | 178        |
| 2.1 Microscopie .....   | 179        |
| 2.2 Rendements d'encapsulation.....   | 180        |
| 3. Chlorhexidine.....   | 180        |
| 3.1 Microscopie .....   | 181        |
| 3.2 Rendements d'encapsulation.....   | 181        |
| PARTIE VII : ENCAPSULATION DE L'EXTRAIT DE PLANTE A .....                               | 184        |
| 1. Observations microscopiques.....   | 184        |
| 2. Rendements d'encapsulation .....   | 186        |
| PARTIE VIII : CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....  | 187        |
| <b>CHAPITRE IV .....</b>  | <b>189</b> |
| <b>MATERIEL ET METHODES .....</b>   | <b>189</b> |
| PARTIE I : FORMULATION COSMETIQUE .....   | 190        |
| 1. Optimisation de formulations cosmétiques par diminution de l'activité de l'eau ..... | 190        |
| 1.2. Aw-mètre.....  | 190        |
| 1.2. Formules témoins .....   | 190        |
| 1.3. Modélisation moléculaire .....   | 190        |
| 2. Analyse HPLC des extraits et dosage .....  | 191        |
| 2.1 Analyse HPLC des extraits de plantes .....  | 191        |
| 2.2 Dosage de l'actif de la plante A.....   | 192        |
| 3. Analyses microbiologiques .....  | 193        |
| 3.1. Analyses microbiologiques des extraits végétaux.....                               | 193        |
| 3.1.1 Principe de la méthode d'analyse.....   | 193        |
| 3.1.2 Milieux de culture, souches .....   | 193        |
| 3.1.2.1 Milieux de culture gélosés.....   | 193        |
| 3.1.2.2 Milieux de culture liquide.....   | 193        |
| 3.1.2.3 Souches de référence.....   | 194        |
| 3.1.3 Mode opératoire.....  | 194        |
| 3.1.3.1 Préparation des cultures .....  | 194        |
| 3.1.3.2 Dosage des spores, de la levure et de la suspension bactérienne.....            | 194        |
| 3.1.4 Conduite de l'essai.....  | 195        |
| 3.2. Challenges tests .....   | 196        |
| 4. Formulation des extraits.....  | 198        |
| 4.1. Solubilisation des extraits .....  | 198        |
| 4.1.1 Support solide.....   | 198        |
| 4.1.2 Support liquide .....   | 198        |
| 4.2. Dosage de l'actif dans les produits cosmétiques : HPTLC .....                      | 199        |
| 4.2.1 Préparation et incorporation des extraits en cosmétique.....                      | 199        |
| 4.2.2 Développement de la méthode de dosage par HPTLC.....                              | 199        |

|                                 |  |     |
|---------------------------------|--|-----|
| 4.2.3                           | <i>Extraction de l'actif de plante A</i> .....   | 201 |
| 4.2.4                           | <i>Dosage de l'actif par HPTLC</i> .....   | 201 |
| PARTIE II : ENCAPSULATION ..... |  | 202 |
| 1                               | Développement et validation d'un système d'encapsulation .....                                 | 202 |
| 1.1                             | Gélation ionotropique .....  | 202 |
| 1.1.1                           | <i>Matières premières</i> .....  | 202 |
| 1.1.2                           | <i>Réticulation directe</i> .....  | 202 |
| 1.1.3                           | <i>Réticulation indirecte</i> .....  | 202 |
| 1.2                             | Coacervation complexe : gomme arabique/lécithine .....   | 203 |
| 1.2.1                           | <i>Matières premières</i> .....  | 203 |
| 1.2.2                           | <i>Protocole opératoire</i> .....  | 203 |
| 1.2.3                           | <i>Essais réalisés</i> .....   | 203 |
| 1.3                             | Vésicules multilamellaires type oignons.....   | 204 |
| 2                               | Développement et optimisation des vésicules multilamellaires : Oignons.....                    | 204 |
| 2.1                             | Phospholipides.....  | 204 |
| 2.2                             | Analytes modèles .....   | 205 |
| 2.3                             | Solubilisation des actifs .....  | 205 |
| 2.4                             | Microscope optique.....  | 205 |
| 2.5                             | Granulométrie .....  | 206 |
| 2.6                             | Préparation des échantillons: Chromatographie d'exclusion stérique .....                       | 207 |
| 2.6.1                           | <i>Fractionnement des oignons : Rutine et Naringénine</i> .....                                | 208 |
| 2.6.2                           | <i>Fractionnement des oignons : Acides benzoïque et salicylique</i> .....                      | 208 |
| 2.6.3                           | <i>Fractionnement des oignons : Méthylchloroisothiazolinone et Méthylisothiazolinone</i> ..... | 208 |
| 2.6.4                           | <i>Fractionnement des oignons : Chlorhexidine</i> .....  | 209 |
| 2.7                             | Méthode de séparation : Ultracentrifugation.....   | 209 |
| 2.8                             | Méthode de dosage par HPLC-DAD .....   | 210 |
| 2.9                             | Test d'activité anti-oxydante.....   | 212 |
| 2.10                            | Méthode de dosage par HPTLC.....   | 213 |
| 2.10.1                          | <i>Dosage de la Rutine par HPTLC</i> .....   | 214 |
| 2.10.2                          | <i>Validation de la méthode</i> .....  | 214 |
| 2.10.3                          | <i>Préparation des échantillons</i> .....  | 214 |
| 2.10.3.1                        | <i>Lotion</i> .....  | 214 |
| 2.10.3.2                        | <i>Crème</i> .....   | 215 |
| CONCLUSION GENERALE .....       |  | 216 |
| BIBLIOGRAPHIE .....             |  | 232 |







## INTRODUCTION GENERALE

L'ensemble de ces travaux de thèse a été réalisé au sein du groupe Métabolome, Valorisation de la Biodiversité Végétale (MVBV) de l'Institut de Chimie de Nice (ICN) ainsi que dans les laboratoires de SO.F.I.A. Cosmétiques, dans le cadre d'une collaboration CIFRE. Une co-direction a également été établie avec le laboratoire de Chimie et Biologie des Membranes et Nano-objets (CBMN) de l'université de Bordeaux. Ces travaux s'inscrivent dans une optique de valorisation du végétal pour l'industrie cosmétique ainsi que pour la mise sur le marché de conservateurs naturels.

Dans un contexte socio-économique où les avancées technologiques évoluent de plus en plus vite, le secteur cosmétique doit constamment innover. L'accès à l'information étant largement facilité, le consommateur se tient au fait des innovations technologiques et souhaite les utiliser à son avantage tout en rejetant celles susceptibles de lui nuire même si les preuves scientifiques manquent à certaines affirmations médiatiques.

Fort de cette tendance, l'industrie cosmétique valorise et démontre l'efficacité de ses produits grâce à des tests toujours plus performants.

Mais dans ce marché où la médiatisation et le marketing orientent largement les comportements individuels et collectifs, la performance ne suffit pas toujours. Dans une société où les modes et tendances sont maîtresses, les produits cosmétiques doivent séduire. Aussi, alors que le retour au naturel s'impose largement, l'industrie cosmétique doit s'adapter. A cela s'ajoute l'évolution des réglementations qui, au fil des modifications, obligent à revoir des produits ou à développer de nouveaux tests. C'est ainsi que des réglementations ont vu le jour afin d'encadrer le développement de produits naturels et/ou biologiques. Enfin, le caractère éphémère de la nouveauté dans le domaine des produits cosmétiques, intimement lié à la multiplication de la concurrence, oblige à innover constamment et très rapidement. En effet, après 2-3 ans sur le marché, un principe actif qui aura séduit sera passé et devra être remplacé par une nouvelle idée.

C'est dans ce contexte que s'inscrit le projet NATUBAVAL (NATUrel BActericide VALorisation). En effet, alors que des conservateurs de synthèses tels que les parabènes remplissent leur rôle avec succès depuis de nombreuses années, une polémique mettant en cause leur innocuité ainsi qu'une récente révision de la réglementation obligent les scientifiques et industriels concernés à chercher des alternatives. Ce projet a donc été instauré afin de trouver des alternatives naturelles aux conservateurs de synthèse. Le but est d'apporter des réponses aux évolutions de la réglementation et aux demandes des consommateurs. De plus, ce projet a pour objectif de valoriser le patrimoine végétal et de créer de nouvelles filières végétales. En effet, les végétaux ont la capacité de s'adapter à leur environnement en développant par exemple des systèmes de défense pour résister à quantité d'attaques microbiennes. Fort de plusieurs acteurs, les premières étapes du projet ont permis de sélectionner une soixantaine de plantes dont 20 ont été testées pour évaluer leur potentiel antimicrobien.

Parmi ces plantes, 3 se sont montrées prometteuses et ont été étudiées par Florence Merck, doctorante à l'ICN. L'étude phytochimique de ces plantes avait pour objectif d'identifier les molécules jouant un rôle dans l'activité recherchée.

Les objectifs de ce travail de thèse ont donc été de comprendre et d'étudier les facteurs d'impacts sur la conservation de produits cosmétiques et d'optimiser et tester les extraits de plantes conservateurs (parmi les 3 plantes prometteuses) dans ces matrices spécifiques. De plus, ayant à l'esprit que les conservateurs naturels tendent à être moins efficaces que les molécules de synthèse, un système d'encapsulation et vectorisation d'actifs a été développé afin d'optimiser un ingrédient conservateur efficace à plus long terme.

Le premier chapitre de cette thèse est consacré à l'étude bibliographique. Dans une première partie, des généralités sur la composition des produits cosmétiques et les contraintes réglementaires sont présentées. Puis un rappel sur les conservateurs généralement utilisés et autorisés est ajouté avant d'aborder l'utilisation de substances naturelles aux propriétés antimicrobiennes en cosmétique. Finalement, les facteurs de formulations, production et conditionnement impactant la conservation sont étudiés.

Les techniques d'encapsulation d'actifs étant nombreuses, la deuxième partie de ce premier chapitre examine les procédés les plus communs ainsi que leurs spécificités. De plus, les contraintes de formulation ainsi que l'origine des matières premières composant les systèmes (naturel ou synthétique) sont évaluées.

Le deuxième chapitre de ce manuscrit décrit les résultats obtenus dans le cadre de l'optimisation de la conservation cosmétique. La première partie est consacrée à l'impact de différentes matières premières cosmétiques sur l'activité de l'eau, facteur d'influence sur la croissance microbienne. Les résultats antimicrobiens ont alors été discutés. Puis les extraits conservateurs sélectionnés dans le cadre de l'étude ont été évalués seuls et en milieux formulés pour leurs activités antibactérienne et antifongique. Les extraits prometteurs ont alors été optimisés en fonction des contraintes de formulation et de l'activité antimicrobienne mesurée. Une méthode de dosage a été développée afin de suivre la potentielle dégradation de l'actif d'intérêt dans l'extrait antimicrobien incorporé dans des formulations cosmétiques.

Le troisième chapitre est consacré à la sélection d'un système d'encapsulation répondant à nos critères de sélection. Le procédé choisi est alors optimisé pour l'encapsulation d'analytes modèles : la rutine et la naringénine. Une cinétique de fuite de la rutine encapsulée est ensuite réalisée ainsi que la mise au point d'un test antioxydant pour évaluer la bonne protection de l'actif. Une méthode de dosage est alors appliquée pour comparer le comportement des capsules dans différents produits cosmétiques. L'encapsulation est ensuite élargie à d'autres molécules sélectionnées parmi les conservateurs autorisés par la réglementation cosmétique afin de comprendre et discuter la sélectivité du système. Enfin, le système développé est appliqué à l'encapsulation d'extraits naturels.

Le dernier chapitre développe les méthodes et techniques utilisées dans le cadre de ces travaux de thèse. Des méthodes de préparations d'échantillons ont été comparées et optimisées selon les contraintes posées par les matrices complexes que sont les produits cosmétiques et les capsules. Des modèles mathématiques ont été proposés pour définir un système d'encapsulation optimal. Puis des méthodes de dosages ont été développées par chromatographie liquide sur couche mince afin de caractériser le comportement des actifs et extraits dans les matrices utilisées. Enfin, des tests d'activités antioxydant et antimicrobien ont été réalisés afin de valider le potentiel des ingrédients conservateurs développés tout au long de ces travaux.





# CHAPITRE I

## RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES



## INTRODUCTION

Avec une réglementation en constante évolution, l'industrie cosmétique doit sans cesse s'adapter et revoir ses habitudes. De plus, dans ce secteur, la durée de vie d'un produit sur le marché est très courte (2 à 3 ans environ) ce qui impose un rythme d'innovation plus que soutenu. Il est donc normal d'être constamment à la recherche de produits innovants et adaptés au marché. Ainsi, alors que la réglementation cosmétique vient d'interdire l'utilisation de certains parabènes (9 avril 2014), il est primordial de trouver des substituts à ces molécules. Afin de les remplacer efficacement et durablement, il est nécessaire de comprendre et maîtriser les sources de contaminations et résistances microbiologiques. Ce chapitre bibliographique a donc pour objectif de définir les contraintes réglementaires de la conservation cosmétique puis d'indiquer les alternatives naturelles aux conservateurs classiques permettant de protéger plus ou moins efficacement ces produits. Cet état de l'art permettra alors de définir la nature des extraits naturels prometteurs dans cette perspective.

La connaissance du potentiel antimicrobien de certaines matières premières cosmétiques est également nécessaire pour avancer dans une logique d'optimisation de la conservation. Enfin, une bonne compréhension des modes de contamination bactérienne et fongique ainsi que la connaissance des facteurs de croissance et de multiplication des microorganismes permettent d'adopter une stratégie de lutte contre les développements microbiologiques.

Les produits cosmétiques protégés à l'aide de conservateurs naturels actuels présentent bien souvent une durée de vie réduite par comparaison avec les produits conservés avec les molécules de synthèse usuelles. Aussi, l'objectif de la deuxième partie de cette revue bibliographique consacrée à l'encapsulation est de définir un système de protection d'extraits naturels antimicrobiens adapté à une incorporation dans des matrices cosmétiques, tout en permettant une préservation de la biodisponibilité et un relargage ralenti des actifs d'intérêts. La sélectivité des systèmes pour l'encapsulation d'actifs en fonction de leurs propriétés ainsi que les contraintes de formulations sont particulièrement mises en avant. Des facteurs tels que l'absence de solvants organiques et/ou de matières premières issues de la synthèse sont tout particulièrement mis en avant, en adéquation avec les contraintes du projet.



## PARTIE I : LES COSMETIQUES

La mise sur le marché d'un produit cosmétique est soumise à une réglementation en constante évolution et toujours plus rigoureuse. Les critères de spécificité d'une formulation à usage cosmétique sont précisément définis dans la réglementation cosmétique (règlement (CE) n°1223/2009 du Parlement européen et du conseil du 30 novembre 2009). Ce règlement est entré en vigueur dans sa totalité le 11 juillet 2013. Parmi les critères définis dans ce document, l'annexe I exige la rédaction d'un rapport sur la sécurité du produit cosmétique. Les renseignements concernant la qualité microbiologique du produit cosmétique font partie des spécifications devant apparaître dans cet écrit. Afin de répondre à une qualité optimale dans ce domaine, la même réglementation fournit une liste de conservateurs autorisés ainsi que les critères permettant de valider l'innocuité du produit pour le consommateur [1].

La liste des conservateurs autorisés présentée dans ce document réglementaire, comporte – parmi les 57 substances citées – les méthyl, éthyl, propyl et butyl parabènes et leurs sels. Ces quatre familles de molécules dont l'utilisation est aujourd'hui fortement controversée sont pourtant dotées d'une activité et d'une efficacité bien connues et rarement égalées. Cette liste de conservateurs contient également des alternatives chimiques que l'on retrouve à l'état naturel. Certaines de ces alternatives, telles les acides benzoïque ou salicylique, sont également acceptées par la réglementation COSMOS, organisme de certification des produits biologiques.

Outre ces conservateurs, certaines autres matières premières possèdent une activité antimicrobienne notoire, sans pour autant se voir assigner le titre de conservateur car elles ne sont tout simplement pas référencées comme tel. De nombreux extraits végétaux entrent dans cette catégorie.

Bien que la démarche classique du développement d'un produit cosmétique en vue d'optimiser son système de conservation soit l'incorporation de conservateur et/ou de matières premières aux propriétés antimicrobiennes, d'autres alternatives sont envisageables. En effet, la modification de certains paramètres physico-chimiques au sein des formulations peut avoir une influence plus ou moins significative sur la capacité du produit fini à résister aux développements bactériens et/ou fongiques.

L'étude bibliographique de ces différents points permettra de comprendre tout l'enjeu et la nécessité pour l'industrie cosmétique de mieux comprendre les phénomènes physico-chimiques influençant la conservation des produits finis et d'y associer des matières premières au potentiel antimicrobien les plus adaptées. L'obligation pour l'industriel est que le produit fini mis sur le marché réponde aux exigences microbiologiques de la réglementation.

## 1. QU'EST-CE QU'UN PRODUIT COSMETIQUE ?

### 1.1 Définition

Le mot français « cosmétique » dérive du mot grec *kosmêtikos*, qui signifie « habile pour parer ». Dans l'état des connaissances actuelles, force est de constater que l'homme a toujours eu le désir de se constituer une belle parure, usant à cet effet de toutes sortes de ressources à disposition afin d'en faire des objets d'embellissement et de soins.

Ce constat n'a pas changé, preuve en est la définition que donne le règlement (CE) n°1223/2009 du Parlement européen et du conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques :

*« On entend par produit cosmétique toute substance ou mélange destiné à être mis en contact avec les diverses parties superficielles du corps humain, notamment l'épiderme, les systèmes pileux et capillaires, les ongles, les lèvres et les organes génitaux externes, ou avec les dents et les muqueuses buccales, en vue, exclusivement ou principalement, de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect, de les protéger, de les maintenir en bon état ou de corriger les odeurs corporelles ».*

### 1.2 Composition

La forme finale d'un produit cosmétique résulte du mélange d'ingrédients judicieusement choisis et associés, appartenant à trois grandes familles de composés :

- Le principe actif qui définit l'efficacité du produit cosmétique,
- L'excipient, qui définit la forme finale du produit et vectorise les actifs [2],
- Les additifs, qui contribuent à l'amélioration des propriétés du produit fini.

#### 1.2.1 Actifs

L'activité et l'efficacité ciblées des produits cosmétiques dépendent tout particulièrement du ou des principes actifs introduits. Le pourcentage en actifs est généralement de 2 à 3 %. Les activités les plus revendiquées par le secteur sont l'hydratation (agents humectants, filmogènes, occlusifs)[3], les effets anti-âge (anti-rides, antioxydants) [4] et photoprotecteurs (anti-UVA et UVB) [5].

#### 1.2.2 Excipients

L'excipient joue le rôle de support dans le produit. Il définit la forme finale (gel, émulsion fluide ou épaisse, émulsion huile/eau ou eau/huile...) et donne une texture. Il participe en particulier à la pénétration de l'actif dans l'épiderme, au dépôt des actifs sur les fibres capillaires, sur les dents, etc...

Il peut être de nature hydrophobe (huiles, cires, acides et alcools gras, gélifiants), hydrophile (gélifiants) ou amphiphile (tensioactifs).

Par exemple, les tensioactifs, quasi omniprésents dans la formulation des émulsions, modulent la pénétration des molécules actives tout en ayant une capacité de pénétration propre [2].

### 1.2.3 Additifs

Les additifs regroupent les ingrédients ayant pour objectif de conserver, parfumer, colorer le produit cosmétique.

- Les conservateurs ont pour but d'empêcher la prolifération des microorganismes. Aujourd'hui, ils sont majoritairement d'origine synthétique, mais de plus en plus de « conservateurs » d'origine naturelle sont présents dans les cosmétiques.
- Les parfums sont des compositions liposolubles de substances odorantes, participant au plaisir de l'utilisation du produit. Ils apportent également une spécificité propre au produit dont l'utilisateur se souvient. De plus, certaines substances parfumantes (huiles essentielles) peuvent présenter une activité.
- Les colorants confèrent au produit une couleur adaptée et un aspect plus attractif [6].

## 2 CONSERVATION ET CONSERVATEURS

### 2.1 Qu'est-ce qu'un conservateur ?

La réglementation cosmétique ((CE) n°1223/2009) définit par « *agents conservateurs les substances qui sont exclusivement ou principalement destinées à empêcher le développement de micro-organismes dans le produit cosmétique* ». Cette définition n'inclue donc pas les actions contre la dégradation chimique apportées par les antioxydants par exemple.

### 2.2 Pourquoi la conservation ?

Les conservateurs jouent plusieurs rôles dans la protection des produits cosmétiques. Ils permettent tout d'abord la protection des produits cosmétiques des contaminations pouvant être apportées lors de leur production par :

- les matières premières (principes actifs, eau, colorants...) ;
- les articles de conditionnement ;
- l'atmosphère des locaux ;
- le personnel.

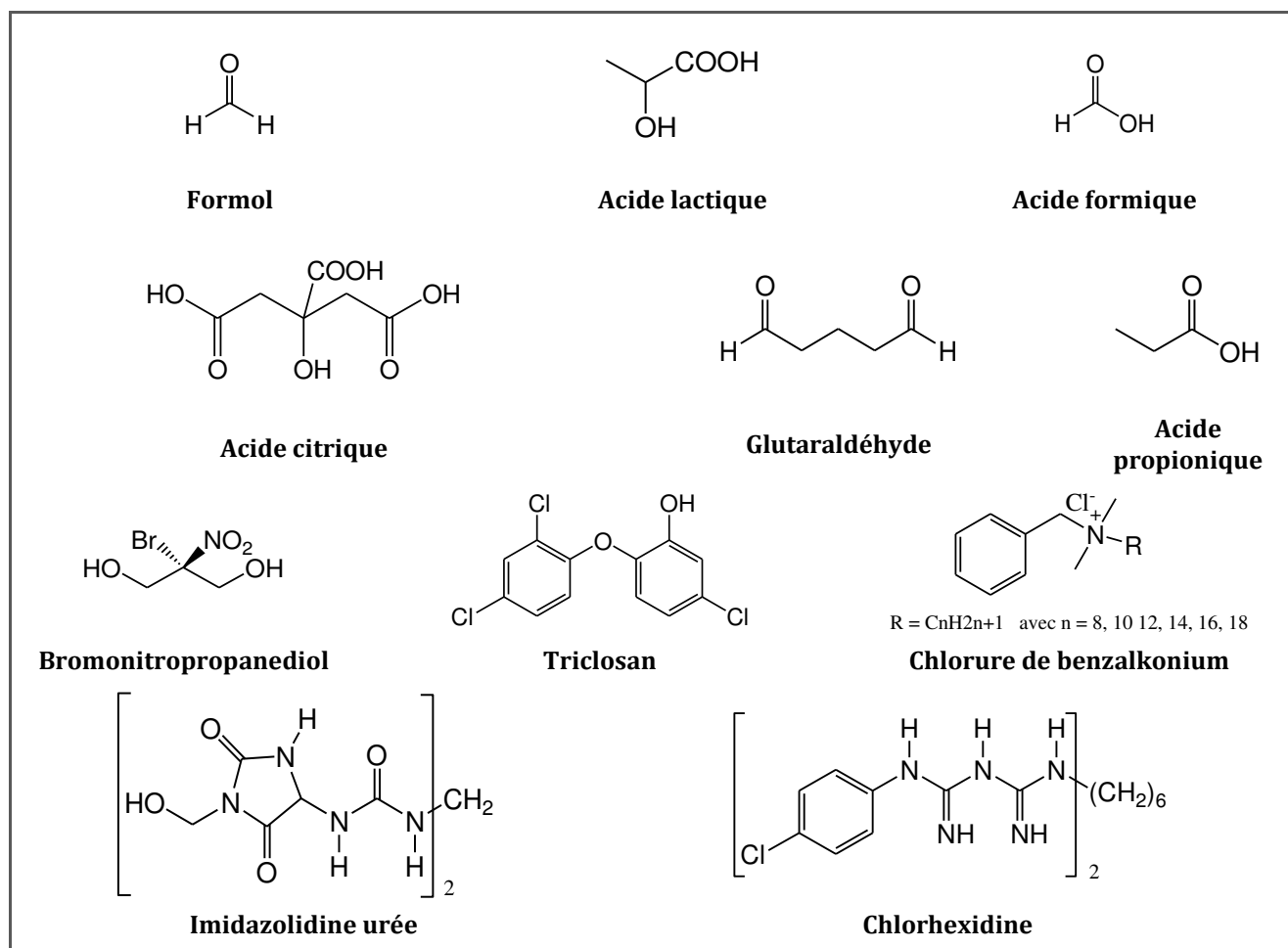
Or, les contaminations génèrent la dégradation anticipée du produit cosmétique, le rendant inapte à l'utilisation, voire dangereux pour le consommateur.

Ils ont également un rôle de protection lors de l'utilisation du produit par le consommateur qui le pollue lors du prélèvement.

La majorité des produits cosmétiques doivent donc contenir des conservateurs. Néanmoins, selon leur nature, composition ou packaging, leur présence et concentration peuvent être très différentes. Certains produits font exception et ne nécessitent pas de conservateur. C'est le cas par exemple des lotions alcooliques dont la concentration en alcool est supérieure à 20 %.

## 2.3 Réglementation

### 2.3.1 Directive européenne



Encart 1 : exemple de conservateurs utilisés en cosmétique.

En Europe, les conservateurs antimicrobiens pouvant être utilisés dans les produits cosmétiques sont inscrits sur une liste positive : l'annexe V de la Directive cosmétique européenne (arrêté du 6 février 2001 pour la législation française). Cette réglementation fixe également leurs concentrations, leurs limites et conditions d'utilisation (ANNEXE 1). Cette liste (tout comme les différentes listes de la réglementation) est en constante évolution en fonction des connaissances toxicologiques relatives aux divers ingrédients cosmétiques et aux utilisations qui en sont faites. Les antioxydants n'en font pas partie. L'Encart 1 expose quelques exemples de conservateurs utilisés.

Certaines substances peuvent également être utilisées dans la formulation de produits cosmétiques et posséder des propriétés antimicrobiennes, elles contribuent ainsi à la conservation du produit. Néanmoins, ces substances – principalement des alcools et huiles essentielles – n'étant pas dans l'annexe V, ne sont pas considérées comme des conservateurs.

### 2.3.2 *Cosmetics Organic Standard (COSMOS-standard)*

#### 2.3.2.1 Les cosmétiques biologiques

Pour se voir attribuer l'appellation biologique, les produits cosmétiques doivent répondre à plusieurs critères relatifs à leur production, fabrication et conservation.

En France, les produits cosmétiques bio labellisés ECOCERT doivent contenir au minimum 95 % de matières premières d'origine naturelle pour être certifiés. Les végétaux utilisés doivent être issus de l'agriculture biologique ou biodynamique et les procédés de transformation que doivent subir certaines matières premières doivent être verts. Les concentrations en substances de synthèses dans ces produits sont très limitées (< 5 % pour ECOCERT).

#### 2.3.2.2 COSMOS-standard

COSMOS est une norme privée à échelle européenne développée par cinq membres fondateurs :

- BDIH (Allemagne)
- Cosmebio (France)
- Ecocert Greenlife SAS (France)
- ICEA (Italie)
- Soil Association (Grande Bretagne)

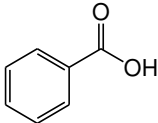
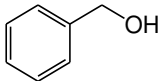
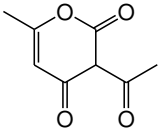
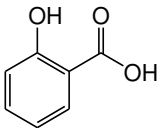
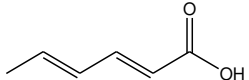
Deux des objectifs de cet organisme sont de définir des exigences minimales communes et d'harmoniser des règles de certification des cosmétiques biologiques et naturels.

La version 1.1 du 31 Janvier 2011 de COSMOS-standard (Annexe V) autorise les conservateurs suivants :

- Acide benzoïque et ses sels
- Alcool benzylique
- Acide déhydroacétique et ses sels
- Acide salicylique et ses sels
- Acide sorbique et ses sels
- Benzoate de dénatonium et alcool butylique tertiaire

Les conservateurs autorisés par ce référentiel sont des molécules obtenues par synthèse mais présentes dans la nature (Tableau 1).

**Tableau 1 : données sur l'origine, la nature et le potentiel antimicrobien des agents de conservation autorisés par le référentiel Cosmo-Standard**

| Agent conservateur                | Exemple de présence dans la nature   | pKa  | Structure chimique   | Activité antimicrobienne  | Références |
|-----------------------------------|--|------|--|---|------------|
| Acide benzoïque et ses sels       | Dans certains légumes tels que les carottes et fruits rouges tels que les framboises ou les canneberges. | 4,2  |   | Surtout efficace contre les levures   | [7,8]      |
| Alcool benzylique                 | Huile essentielle d'Ylang Ylang ( <i>Cananga odorata</i> Lam.)   | ~ 16 |   | Surtout actif contre Gram (+)<br>Activité plus limitée contre Gram (-) et les levures<br>Faible activité contre les moisissures | [9,10,11,] |
| Acide déhydroacétique et ses sels | Fleurs de Solandre ou Liane trompette ( <i>Solandra grandiflora</i> )                                    | 5,3  |   | Surtout efficace contre les levures et moisissures<br>Inefficace contre <i>Pseudomonas</i>                                      | [18,12]    |
| Acide salicylique et ses sels     | Sous forme d'hétérosides dans la reine des prés ( <i>Filipendula ulmaria</i> L.)                         | 3,0  |   | Meilleure activité contre Gram(+) et certaines Gram(-).<br>Bonne activité antifongique  | [13]       |
| Acide sorbique et ses sels        | Graines de Sorbier de l'oiseleur ( <i>Sorbus aucuparia</i> L.)   | 4,8  |  | Essentiellement antifongique, actif également contre les levures et certaines bactéries Gram (-)                                | [15]       |

## 2.4 Les conservateurs de synthèse

### 2.4.1 Conservateurs autorisés et modes d'actions

Les conservateurs autorisés sont tous d'origine synthétique. Ils présentent des modes d'action, des activités et des propriétés physico-chimiques très variables. La liste positive des conservateurs autorisés est présentée en ANNEXE 1.

Le choix du conservateur (ou mélange de conservateurs) utilisé pour protéger un produit cosmétique se fait selon les critères suivants [14]:

- **Spectre d'activité** : il doit être le plus large possible (activité vis à vis des bactéries, levures et moisissures). Des mélanges sont souvent utilisés (et vendus tels quels) afin d'atteindre de bons résultats.
- **Compatibilité avec le procédé de fabrication**, en particulier si une étape de chauffage intervient.
- **Solubilité dans l'eau** : la phase à protéger en priorité étant la phase aqueuse car au centre des développements microbiens, le conservateur doit être soluble dans celle-ci à la concentration efficace [15].
- **pH de la formulation** : nombreux sont les conservateurs dont l'activité est liée au pH du milieu. Les phénols et esters de l'acide *p*-hydroxybenzoïque se comportent comme des acides faibles et sont donc moins affectés par le pH. Les conservateurs cationiques sont, quant à eux, plus actifs sous leur forme ionisée.
- **Coefficient de partage huile/eau** : lorsque la formule à protéger est une émulsion, le conservateur va se partager en fonction de ses solubilités dans la phase aqueuse et la phase lipidique. Afin d'être le plus efficace possible, son coefficient de partage huile/eau doit donc être le plus faible possible.
- **Compatibilité avec les autres ingrédients** : la présence de certaines matières premières peut abaisser le potentiel antimicrobien des molécules conservatrices. Par exemple certains agents de surface inhiberaient l'activité antimicrobienne par solubilisation micellaire (ex : tensioactifs non-ioniques).
- **Compatibilité avec les matériaux de conditionnement** : certains matériaux polymériques peuvent adsorber les conservateurs et abaisser ainsi leur concentration effective dans le produit fini.

Les acides organiques sont l'une des classes de conservateurs très utilisée. Ils possèdent un double effet antimicrobien. Tout d'abord par l'acidification du milieu (3.1.1.3) mais également par un effet spécifique de l'acide utilisé.

En effet, les acides organiques faibles peuvent agir pour inhiber les microorganismes. Ils sont lipophiles, donc capables de traverser la membrane de ces organismes vivants et ainsi de pouvoir modifier le pH cytoplasmique. C'est la forme non dissociée ou protonée (COOH) qui présente un effet spécifique sur les microorganismes. En effet, une fois la membrane cellulaire traversée, l'acide se dissocie, ce qui a pour effet de changer le pH intracellulaire. Les microorganismes doivent alors évacuer les protons et absorber des ions sodium pour maintenir le pH physiologique de la cellule. Ce procédé est énergivore

pour la bactérie ce qui diminue sa vitesse de reproduction. Ce procédé abaisse également le pH en périphérie de la cellule, favorisant ainsi la formation de la forme protonée de l'acide qui est l'espèce active. L'aboutissement de ce procédé est la mort du microorganisme. Ce sont donc ces acides qu'il faut privilégier dans le cas d'une formule dont on veut optimiser l'autoconservation. Les acides organiques sont pour la plupart des acides faibles et sont donc à privilégier. Ainsi, plus le pH est acide, plus la concentration sous forme protonée de l'acide est importante et plus son efficacité est élevée. Donc, pour un pH donné, l'acide est d'autant plus actif qu'il possède un pKa élevé. Mais il faut également tenir compte de la solubilité de l'acide qui doit être suffisante en phase aqueuse. De plus, l'acide doit être disponible dans sa forme protonée au pH de la formule [16,17].

Les acides citrique et lactique sont également très utilisés en cosmétique pour ajuster le pH. L'acide citrique agit plus en tant qu'agent chélatant et présente donc une activité antibactérienne. L'acide lactique est un agent bactériostatique.

Les acides lévulinique et anisique sont également deux formes actives contre les microorganismes mais dont la fonction première est de parfumer le produit cosmétique. Ils figurent donc comme parfum dans la liste des ingrédients [16,17].

#### 2.4.2 *Le cas des parabènes*

Les parabènes sont des conservateurs à large spectre antimicrobien. Ils sont utilisés depuis 1920 pour de nombreux produits que nous consommons quotidiennement : aliments, produits cosmétiques, médicaments. Les concentrations et types de parabènes utilisés diffèrent selon les produits. Ils existent également à l'état naturel dans de nombreux aliments comme les fruits rouges (mûres, fraises, cassis...), l'oignon ou encore la carotte [18,19,20,21,22].

En cosmétique, ils sont autorisés aux concentrations de 0,4 % (forme acide) pour les esters et 0,5 % (acide) pour les mélanges d'esters mais sont employés à très faibles concentrations. Ils sont hydrolysables par l'organisme et présentent une bonne tolérance.

Les plus utilisés, sous leur forme sodée ou non sodée, sont :

- Le méthyl parabène,
- L'éthyl parabène,
- Le propyl parabène,
- Le butyl parabène.

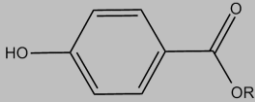
Ils sont généralement vendus sous forme de mélanges qui contiennent 3 ou 4 parabènes différents, pouvant parfois être associés à un alcool (Nipastat®, Phenonip®) ou des précurseurs du formaldéhyde ou des isothiazolinones. Ces mélanges sont nécessaires car ces 4 parabènes ont des profils de solubilité différents ainsi qu'une activité antimicrobienne spécifique. Plus la chaîne alkyle est longue et plus le parabène est liposoluble. Ainsi les mélanges permettent de couvrir un spectre d'activité plus large.



Les parabènes sont des composés simples, constitués d'un cycle aromatique, d'une fonction hydroxy et ester en position para. Leur nom vient de la compression du nom PARAhydroxyBENZOATE.

Le Tableau 2 présente la structure et les propriétés physico-chimiques des principaux parabènes utilisés en cosmétique.

Tableau 2 : structures et propriétés physico-chimique des parabènes

| Structure générale                   |                                       |  |             |           |
|--------------------------------------|---------------------------------------|--|-------------|-----------|
| R                                    | méthyl                                | éthyl  | propyl      | butyl     |
| N° CAS                               | 99-76-3                               | 120-47-8   | 94-13-3     | 94-26-8   |
| N° EINECS                            | 202-785-7                             | 204-399-4  | 202-307-7   | 202-318-7 |
| Masse molaire (g/mol)                | 152,05                                | 166,6  | 180,08      | 194,0     |
| Point de fusion (°C)                 | 131                                   | 116-118  | 96-98       | 68-69     |
| Point d'ébullition (°C)              | 270-280                               | 397-298  | Dégradation | 156-157   |
| Solubilité dans l'eau à 25 °C (en %) | 0,25                                  | 0,17   | 0,05        | 0,02      |
| pKa                                  | 8,17                                  | 8,22   | 8,35        | 8,37      |
| Apparence (à 25 °C)                  | Cristaux sans couleur, odeur, ni goût |  |             |           |

Lorsque la longueur de leur chaîne alkyle augmente, leurs propriétés antibactériennes augmentent, mais leur solubilité en phase aqueuse diminue. Cette dernière étant la plus sensible aux attaques microbiennes, il est alors fréquent d'utiliser les plus solubles dans l'eau, bien que moins actifs.

Cette différence d'activité/solubilité selon la longueur de la chaîne explique l'utilisation de la combinaison de plusieurs parabènes.

Les parabènes sont bactéricides. Leur mécanisme d'action sur les microorganismes est encore mal connu. Ils agissent contre un grand nombre de microorganismes au niveau de voies métaboliques clés. En effet, il est supposé que les parabènes inhibent la synthèse de l'ADN et de l'ARN ou de certaines enzymes clefs des microorganismes ou encore qu'ils perturbent les processus de transport membranaire au sein de ces cellules vivantes [23].

Ils agiraient en se fixant sur la membrane cytoplasmique des microorganismes entraînant une rupture puis une destruction de cette dernière. L'organisme se viderait alors d'une partie de son contenu, ce qui conduirait à sa mort.

## 2.5 Extraits naturels et propriétés antimicrobiennes

### 2.5.1 Définition

Parmi les extraits naturels possédant un potentiel antimicrobien, on peut distinguer les huiles essentielles, les extraits aux solvants et certaines huiles végétales. Ils sont tous obtenus à partir de matières premières végétales mais selon des méthodes d'extraction plus ou moins sophistiquées et innovantes définissant le type de molécules extraites (volatiles ou non par exemple), ainsi que la forme finale (liquide, poudre, pâte...). La plupart des végétaux développent, au cours de leur croissance, des mécanismes de défense contre les attaques et stress environnementaux. Ils produisent alors des molécules les rendant résistants à ces phénomènes, notamment des molécules antibactériennes et antifongiques. Ces molécules et activités associées sont retrouvées dans les extraits végétaux [46].

### 2.5.2 Huiles essentielles

Les huiles essentielles sont utilisées depuis des centaines d'années pour leurs propriétés odorantes. Ces dernières années, leurs propriétés antimicrobiennes et antifongiques ont été le centre d'intérêt d'un grand nombre d'études [24]. Aujourd'hui, les industriels de la cosmétique tendent à les utiliser pour substituer les conservateurs de synthèse.

Ces propriétés multiples sont liées à la grande complexité des huiles essentielles, puisqu'elles peuvent être constituées de plusieurs dizaines, voire centaines de constituants [25]. Les molécules responsables de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles sont principalement des hydrocarbures (terpènes), des alcools, particulièrement des phénols, des esters, des acides, des aldéhydes ou encore des cétones. Plus particulièrement, les phénols –thymol, carvacrol, eugénol - font partie des composés ayant montré un excellent potentiel antibactérien ainsi qu'un large spectre d'activité. De tels composés sont par exemple présents dans l'huile essentielle de thym [46, 26].

#### 2.5.2.1 Mode d'obtention

Selon la norme AFNOR [24], les huiles essentielles sont des extraits obtenus :

- Soit à partir de matières premières végétales par distillation à l'eau (hydrodistillation) ou à la vapeur d'eau ;
- Soit à partir des fruits de Citrus par des procédés mécaniques, l'huile essentielle étant ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques ;
- Soit par pyrogénéation de certaines écorces ou bois comme le cade (distillation sèche).

Toutes ces techniques ont en commun de ne jamais utiliser de solvants organiques ou produits chimiques.

### 2.5.2.2 Mode d'action

En ce qui concerne leur activité antimicrobienne, les huiles essentielles peuvent agir selon deux modes en fonction des micro-organismes concernés et du type de molécules qu'elles contiennent. Elles peuvent :

- Soit inhiber la multiplication cellulaire microbienne et ainsi avoir un effet microbiostatique ;
- Soit entraîner la mort des micro-organismes et ainsi avoir un effet microbiocide.

Le mode d'action précis des huiles essentielles reste irrésolu, mais il semblerait que, dans le cas des bactéries, les molécules actives tels que les composés phénoliques attaquent la paroi cellulaire, provoquant une perte du matériel cellulaire par augmentation de la perméabilité. L'intérieur de la cellule serait alors acidifié, entraînant la perte d'ions et la réduction du potentiel membranaire, puis la mort de la cellule des suites de la destruction du matériel génétique [46, 27, 28]. Le système enzymatique bactérien peut également être affecté. Le mode d'action des extraits naturels reste très peu décrit, mais leur activité peut être corrélée avec la présence de certains composés.

### 2.5.2.3 Contraintes de formulation

L'utilisation des huiles essentielles pour leurs propriétés conservatrices pose cependant un certain nombre de problèmes tels qu'une odeur marquée, parfois problématique pour une utilisation cosmétique (incompatibilité entre l'odeur de l'huile essentielle et le produit cosmétique à protéger), ou la présence d'allergènes, sources de réactions cutanées, voire d'allergies de contact. Par exemple, le linalol présent dans l'huile essentielle de lavande et le cinnamaldéhyde de la cannelle sont des allergènes naturels. Notons également que dans certains cas, l'emploi des huiles essentielles est limité, notamment chez les personnes dont la peau est sensible, chez les femmes enceintes et les enfants [90].

### 2.5.3 *Extraits naturels*

Avec la diminution de l'utilisation des matières premières animales, la consommation en extraits végétaux par l'industrie cosmétique ne cesse de croître chaque année. Paradoxalement, il n'existe pas de définition réglementaire officielle pour qualifier les extraits cosmétiques. Il en résulte donc que la dénomination INCI (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*) d'un extrait peut désigner des produits très différents en termes de technologies d'extraction, de concentration en actif, de test d'efficacité et finalement en terme de prix.

#### 2.5.3.1 Modes d'obtention

Les extraits naturels peuvent être obtenus au moyen de solvants (eau et solvants organiques). Le végétal, généralement haché ou broyé, est mélangé avec un solvant qui a la capacité de solubiliser les métabolites d'intérêts. Une fois les débris végétaux éliminés,

le solvant est éliminé (généralement par évaporation sous pression réduite) pour conduire à l'extrait qui se présente sous la forme d'une pâte plus ou moins visqueuse ou d'un solide.

Plusieurs solvants peuvent être utilisés. Ils sont le plus souvent organiques (hexane, éther de pétrole, acétate d'éthyle, éthanol, acétone...). L'éthanol et l'acétone peuvent être utilisés en mélange avec l'eau.

Depuis peu, on assiste au développement de l'extraction à l'aide de fluides supercritiques, et plus particulièrement au dioxyde de carbone. En effet, dans des conditions de température et de pression bien précises, ces fluides à l'état supercritique possèdent des propriétés particulièrement intéressantes pour l'extraction. L'extraction assistée par micro-ondes prend également beaucoup d'ampleur ces dernières années [29]. Ces deux derniers exemples s'inscrivent dans le développement de la chimie verte, notamment l'utilisation de solvants verts (éco-solvants). Pour être ainsi définis, les solvants doivent présenter une faible toxicité, être facile à recycler, faciles à éliminer du produit final et présenter une faible réactivité.

#### 2.5.3.2 Avantages

Les extraits naturels présentent une grande complexité chimique ; leur composition chimique n'est souvent pas bien connue. Un certain nombre d'extraits végétaux ont été étudiés pour leurs propriétés antimicrobiennes et sont aujourd'hui présents sur le marché de la cosmétique, tels que l'extrait de pépins de pamplemousse ou l'extrait de lichen (Tableau 3) [30,31].

#### 2.5.3.1 Contraintes d'utilisation

##### 2.5.3.1.1 Le problème de la solubilité

De très nombreux travaux portent sur les propriétés biologiques d'extraits végétaux. Des paramètres tels que le mode d'extraction, la provenance de la matière végétale ou encore la partie de la plante étudiée sont comparés afin de définir les conditions conférant la meilleure activité biologique mais, bien souvent, un extrait développé de la sorte ne tient pas compte de l'utilisation qui en sera faite ensuite. En fonction de l'utilisation prévue, il est souvent nécessaire de disperser ou solubiliser l'extrait dans des matrices adaptées pour une bonne utilisation de celui-ci. Certains extraits peuvent alors s'avérer difficiles à solubiliser dans les solvants usuels [90,32].

##### 2.5.3.1.2 Couleur des extraits

Les extraits contiennent de nombreuses molécules colorées. Parmi celles-ci, solubles dans les alcools ou mélanges eau-alcool, figurent les flavonoïdes (jaunes à orangés), les anthocyanes (bleus, violet, rouges), les tannins (marrons à bruns) et la chlorophylle [33]. L'incorporation d'un extrait végétal contenant de telles molécules dans un produit cosmétique génère une coloration souvent peu esthétique et limitant le domaine d'application.

Tableau 3 : exemples d'extraits aux propriétés conservatrices présents sur le marché de la cosmétique

| Extraits  | Noms commerciaux   | Actifs   | Activité   | Fournisseurs   | Références |
|---|--|--|--|--|------------|
| <b>Extrait de lichen (Barbe de Jupiter)</b>                                     | <i>Lichen Herbsasol®<br/>Extract PG</i>  | Acides usnique et vulpinique   | Antimicrobienne  | Cosmetochem International                                    | [31,34]    |
| <b><i>Asparagopsis armata</i> (Algue rouge)</b>                                 | Ysaline® 100<br>INCI* : <i>asparagopsis armata</i> extract   | Composés organiques halogénés  | Antimicrobienne<br>( <i>C. albicans</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>V. anguillarum</i> , <i>E. gergiviae</i> , <i>S. aureus</i> ) | Algues & Mer   | [35,36]    |
| <b><i>Podocarpus totara</i> (bois de cœur recyclé)</b>                          | Totarol™<br>INCI : <i>podocarpus totara</i> wood extract   | Totarol (diterpène aromatique C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O)                     | Antimicrobienne ( <i>S. aureus</i> )<br>Antioxydante   | Essentially NZ   | [37,38,34] |
| <b><i>Citrus grandis</i> (pamplemousse, extrait de pépins)</b>                  | P50 VTF-0373<br>INCI : <i>citrus grandis seed</i> extract  | Flavonoïdes polyphénoliques  | Antimicrobienne<br>Antifongique  | Chemie Research & Manufacturing<br>Vege Tech<br>Bio-Botanica | [39,40,34] |
| <b><i>Lonicera japonica</i> – Extrait de chèvrefeuille du Japon (bourgeons)</b> | <i>Plantservative WSr, WMr</i><br>INCI : <i>Lonicera Caprifolium</i> extract, <i>Lonicera Japonica</i> extract | Lonicérine (alcaloïde indolique) acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque (parabène) naturel | Antimicrobienne  | Campo  | [34,41]    |
| <b><i>Viola Tricolor</i> – Extrait de pensées sauvage</b>                       | INCI : <i>viola tricolor</i> extract   | Flavonoïdes, saponines, acide salicylique, vitamine E                                | Antimicrobienne  | Alban Müller International                                   | [42]       |
| <b><i>Pimpinella anisum</i> – Extrait d'anis</b>                                | INCI : <i>pimpinella anisum</i> extract  | Acide <i>p</i> -anisique   | Antimicrobienne  | Active Concepts LLC<br>Alban Müller                          | [43]       |

| Extraits  | Noms commerciaux   | Actifs                  | Activité        | Fournisseurs           | Références |
|---|--|-------------------------|-----------------|------------------------|------------|
| <b><i>Wasabia japonica</i> –<br/>Extrait de wasabi<br/>(ferment de rhizome)</b> | <i>ACB Wasabi</i><br>INCI : <i>Lactobacillus/ Wasabia<br/>japonica</i> Root Ferment<br>Extract | Isothiocyanate d'allyle | Antimicrobienne | Active Concepts<br>LLC | [34,44]    |

\*INCI: *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*.

### 2.5.4 Huiles végétales

Les huiles végétales sont également des extraits naturels pouvant influencer la conservation des produits cosmétiques *via* une activité antioxydante. Ces produits sont obtenus par un procédé mécanique traditionnel de pression, appliqué à des graines ou fruits issus de plantes oléagineuses. La pression dite « à froid » donne une huile qualifiée de vierge, et peut être ensuite traitée par centrifugation ou filtration. Un procédé de chauffage peut être appliqué aux graines en amont de la pression. Dans ce cas, les huiles doivent être raffinées afin d'être nettoyées de toutes impuretés pour leur commercialisation. Ce procédé de raffinage est souvent effectué au niveau industriel pour des questions de rendement [90].

Les huiles végétales sont naturellement plus ou moins riches en antioxydants, composés protégeant contre l'oxydation.

## 3 LES ALTERNATIVES A L'UTILISATION DES CONSERVATEURS

### 3.1 Alternatives de formulation

#### 3.1.1 Activité de l'eau

Afin de se multiplier, les microorganismes doivent être en présence d'eau en quantité suffisante. La quantité d'eau nécessaire à cette croissance microbienne correspond à la quantité « d'eau libre », ou eau « disponible », présente dans la formule [45]. L'eau libre est communément définie par le terme 'activité de l'eau', noté  $a_w$  (*water activity*) [46,47].

##### 3.1.1.1 Définition

L'activité de l'eau correspond à la mesure des molécules d'eau non complexées à d'autres molécules présentes dans la formule. Elle est définie par la pression de vapeur de la solution  $P$  (solutés dans l'eau) divisée par la pression de vapeur du solvant  $P_0$  (l'eau pure) à température constante [14] :

$$a_w = \frac{P}{P_0}$$

Par définition, la pression de vapeur est la pression sous laquelle la formule, placée seule à une température constante, est en équilibre avec sa vapeur. L'activité de l'eau  $a_w$  et l'humidité relative d'équilibre HRE (%) sont liées par la relation suivante :

$$\text{HRE (\%)} = 100 * a_w$$

Ainsi, l'activité de l'eau peut être comprise entre 0,00 (absence totale d'eau) et 1,00 (eau pure) [46,47,48].

### 3.1.1.2 Activité de l'eau et conservation

Pour se développer de manière optimale, les microorganismes doivent être en présence d'eau libre en quantité suffisante. Généralement, une diminution de l' $a_w$  entraîne donc un net ralentissement de la croissance microbienne [49]. En effet, afin de survivre et de se développer, les microorganismes doivent maintenir un état de turgescence à l'intérieur de la cellule, phénomène possible par osmose (phénomène de diffusion à travers une membrane semi perméable, sous l'effet d'un gradient de concentration) avec le milieu extracellulaire. La perte de turgescence aboutira à une augmentation de la phase de latence, une diminution de la croissance et à une réduction du nombre total des cellules microbiennes (NF EN ISO 29621). Ainsi, des produits tels que le talc ou des déodorants sticks, relativement anhydres, ne nécessitent pas que des conservateurs y soient ajoutés. Les industriels choisissent souvent d'en incorporer afin d'éviter toute contamination inhérente au consommateur. Ce dernier peut en effet ajouter de l'eau au produit par inadvertance [47].

Chaque espèce de microorganisme étant spécifique, la valeur minimale de l' $a_w$  pour laquelle la multiplication cellulaire peut avoir lieu varie. Typiquement, les levures et moisissures peuvent se développer à des valeurs d' $a_w$  plus faibles que les bactéries.

Le Tableau 4 donne quelques valeurs minimales d' $a_w$  pour la croissance de microorganismes spécifiques pour la cosmétique. Il faut cependant noter que ces valeurs peuvent varier en fonction de nombreux facteurs spécifiques à la formulation ou au conditionnement.

**Tableau 4 : Valeurs d' $a_w$  minimales permettant la croissance de microorganismes représentatifs, à 25°C**

| Microorganismes                      | $A_w$ minimum |
|--------------------------------------|---------------|
| <b><u>Bactéries</u></b>              |               |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>        | 0,97          |
| <i>Escherichia coli</i>              | 0,95          |
| <i>Staphylococcus aureus</i>         | 0,86          |
| <b><u>Levures et Moisissures</u></b> |               |
| <i>Aspergillus niger</i>             | 0,77          |
| <i>Candida albicans</i>              | 0,87          |

Ainsi, la diminution de l' $a_w$  d'une formulation permet une protection contre la multiplication des microorganismes mais ne permet pas la destruction d'une population contaminante, comme peuvent le faire des conservateurs microbicides. Ainsi, si des microorganismes sont introduits dans le produit au moment de la fabrication (matières



premières contaminées, mauvais nettoyage du matériel de fabrication...), ils resteront présents dans le produit fini. Un produit cosmétique qui serait uniquement conservé selon le facteur 'activité de l'eau' doit donc être fabriqué dans des conditions de fabrication strictes et être conditionné dans un packaging approprié [46,48-50].

#### 3.1.1.3 Facteurs ayant une influence sur l' $a_w$

D'après la définition de l' $a_w$ , il est aisé de comprendre qu'en diminuant le pourcentage d'eau présent dans une formule, l'activité de l'eau s'en trouve abaissée. Mais en réalité, l'eau est l'ingrédient principal d'une grande majorité de produits cosmétiques. Ce facteur n'est donc pas suffisant pour affecter notablement la valeur de l' $a_w$ .

Des études ont montré que certaines matières premières spécifiques et très fréquentes dans l'industrie cosmétique ont une influence sur cette valeur. Les humectants, tels que le glycérol, propylène glycol, et sorbitol et autres matériaux hydrosolubles diminuent l' $a_w$  grâce à la formation de liaisons hydrogènes entre les molécules d'eau et les fonctions hydroxyles de ces molécules. La diminution de l' $a_w$  générée augmente alors le stress imposé aux microorganismes.

Les sels inorganiques, les acides et bases qui servent à ajuster le pH et la viscosité diminuent l' $a_w$ . Les hydrocolloïdes (gomme de xanthane, gomme de guar, etc) utilisés pour augmenter la viscosité permettent d'abaisser la valeur de l' $a_w$  [47,51]. En effet, ces agents texturants forment un réseau tridimensionnel qui limite la mobilité des molécules d'eau dans le milieu.

Les facteurs suivants peuvent également influencer l' $a_w$ :

- l'ordre dans lequel les matières premières sont ajoutées,
- la méthode et le temps d'agitation,
- l'intervalle de temps entre chaque ajout d'ingrédient,
- la température de chaque ingrédient,
- la présence ou l'absence d'agents de surface [46,49].

Ces différents points permettent une interaction plus ou moins bonne entre les molécules d'eau et les ingrédients susceptibles d'interagir.

##### 3.1.1.3.1 Le pH

Tout microorganisme possède un pH de croissance optimum (Tableau 5). Les pH de croissance se situent généralement entre 5 et 8 [52]. D'une manière générale, les bactéries se développent mieux dans des milieux proches de la neutralité alors que les levures et moisissures sont généralement acido-résistantes avec un pH de croissance optimum se situant entre 4 et 6 mais avec des valeurs extrêmes de 2 à 9 pour les levures et de 2 à 11 pour les moisissures.

Le fonctionnement cellulaire microbien dépend du maintien du pH intracellulaire approprié ( $pH_i$ ). Ainsi, plus le pH du milieu dans lequel se trouvent les cellules s'éloigne du  $pH_i$ , plus les microorganismes se trouvent dans des conditions de stress défavorables

à tout développement. Il faut cependant noter que les bactéries sont capables de maintenir un  $pH_i$  plutôt constant, même si le pH extracellulaire fluctue. En effet, les membranes cellulaires ont une perméabilité sélective, permettant ainsi le passage d'ions et de composés spécifiques entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, ce qui assure un maintien du pH intracellulaire qui peut être très différent du pH externe (jusqu'à 2 unités de pH). Cependant, cette régulation est limitée dans le temps [53,54].

Tableau 5 : domaines de pH de croissance des microorganismes

| Microorganismes | pH de croissance |
|-----------------|------------------|
| Bactéries       | 4,0 – 9,0        |
| Levures         | 1,5 – 8,0        |
| Moisissures     | 5,0 - 11         |

Le formulateur possède un large choix d'acides pour équilibrer le pH de ses formules. Il faut noter que les acides forts (ex : acide chlorhydrique) ne jouent un rôle que sur le pH externe des cellules microbiennes alors que les acides faibles, plus lipophiles, sont capables de traverser la membrane cellulaire et d'agir sur le pH cytoplasmique (cf. 2.4.1). [46,16,17].

Cependant, la majorité des produits cosmétiques ont un pH qui se situe entre 5 et 8. En dehors de certaines exceptions, il est donc difficile d'utiliser ce paramètre pour limiter la croissance microbienne au sein du produit fini

#### 3.1.1.3.2 Matières premières

##### ▪ Tensioactifs

Les tensioactifs sont des molécules amphiphiles très utilisées par l'industrie cosmétique, tout particulièrement pour leur capacité à abaisser la tension interfaciale entre deux milieux immiscibles tels qu'une phase aqueuse et une phase huileuse par exemple. Ils sont donc majoritairement employés en tant qu'agents détergents, moussants, mouillants, solubilisants ou dispersants [55,56]. Les tensioactifs sont composés d'une chaîne apolaire (hydrophobe) qui porte à son extrémité une fonction polaire (hydrophile). Ils sont classés en fonction de la nature de leur tête polaire. Sont ainsi distingués les tensioactifs anioniques, cationiques, non-ioniques et amphotères ou zwitterioniques [57]. Parmi ces classes de tensioactifs, certaines sont connues pour présenter un spectre d'activité antimicrobien plus ou moins important. Les interactions entre les tensioactifs antimicrobiens et leurs cellules cibles sont pour la plupart très complexes car elles peuvent découler d'interactions électrostatiques, d'effets hydrophobes ou de la formation de structures secondaires [46,58,59,60].

L'activité bactéricide des tensioactifs cationiques, en particulier les sels d'ammonium

quatenaire, a été très étudiée. Cette famille de molécules altère la perméabilité des cellules membranaires bactériennes, diminuant l'activité et menant à la mort des bactéries cibles. De plus, ces tensioactifs présentent un large spectre d'activité sur l'échelle de pH communément rencontrée en cosmétique, une faible toxicité aux concentrations usuelles, une solubilité élevée dans l'eau et sont bien tolérés par la peau. Il faut néanmoins noter leur inactivation par des tensioactifs anioniques (dont les sels d'acides gras), les fibres du coton et certaines protéines.

Les tensioactifs amphotères ont des propriétés bactéricides notables mais inférieures à celles des sels d'ammonium quaternaire.

Les sels d'acides gras appartiennent à la classe des tensioactifs anioniques. Ils possèdent une activité antimicrobienne qui dépend de la basicité et de l'activité de l'eau du milieu. Lorsqu'ils sont incorporés en concentration supérieure à leur CMC (concentration micellaire critique), ils ont un effet chaotropique sur les cellules membranaires microbiennes (par exemple le sodium dodecyl sulfate ou SDS). Plus précisément, l'action chaotropique entraîne la destruction de la structure spatiale des macromolécules biologiques en interférant avec les liaisons faibles intramoléculaires de type liaisons hydrogène, forces hydrophobes et de Van der Waals [61,62]. De manière générale, les tensioactifs anioniques sont plus efficaces contre les bactéries à Gram positif que celles à Gram négatif. Les autres familles de tensioactifs anioniques ont une activité antimicrobienne faiblement marquée.

Les tensioactifs non-ioniques sont généralement utilisés en tant qu'agents solubilisants. Leur potentiel antimicrobien dépend souvent de leur concentration. En effet, en deçà de leur CMC, ils peuvent exercer une activité contre les microorganismes, alors qu'au-delà de cette valeur, ils risquent d'inhiber l'activité biocide, les agents antimicrobiens se retrouvant en partie encapsulés dans les micelles de tensioactifs [63,64,65]. Cet antagonisme peut toutefois être empêché en évitant la co-micellisation [66].

Le Tableau 6 donne un aperçu des familles de molécules dont plusieurs dérivés ont montré une activité antibactérienne et/ou antifongique significative. Il faut cependant toujours garder à l'esprit que les interactions entre les tensioactifs et les nombreuses molécules présentes au sein des formules cosmétiques peuvent avoir un fort impact sur cette activité [46].

- Acides gras et leurs esters

Les premières études axées sur l'activité germicide des acides gras se sont déroulées au cours des années 1920 à 1940, puis plus tard avec John J. Kabara dans les années 1970 [67,68].

Des tests d'activité antimicrobienne ont été effectués sur des acides gras saturés de chaînes carbonées  $C_6$  à  $C_{20}$ . Puis l'effet des insaturations, de l'isomérisation et de l'estérification sur l'activité a été évalué.

**Tableau 6 : famille de molécules tensioactives dont plusieurs dérivés ont montré une activité antibactérienne et/ou antifongique significative**

| Classification des tensioactifs | Famille de tensioactifs  |
|---------------------------------|--|
| <b>ANIONIQUES</b>               | Sels d'acides gras   |
| <b>CATIONIQUES</b>              | Sels d'ammonium quaternaire<br>Aminimides  |
| <b>AMPHOTÈRES</b>               | Alkyles bétaines<br>Alkyles amidopropylbétaines<br>Alkyles aminopropionates et Alkyles iminodipropionates<br>Alkyles imidazolines<br>Dérivés d'acides aminés   |
| <b>NON IONIQUES</b>             | Monoesters d'acides gras<br>Monoesters d'acides alkylidihydroxybenzoïque<br>Polyéthylène glycol<br>Alkanolamides<br>Dérivés polyoxyéthyléniques<br>Esters de sucres<br>Alkyles glycosides ou Alkyl glycopyranosides<br>Oligosaccharides contenant un groupe amino<br>Diéthanolamides de N-Lauroyl dipeptides |

**Les acides gras :**

Les acides gras sont généralement plus efficaces contre les bactéries à Gram positif que celles à Gram négatif. L'acide laurique (C<sub>12</sub>) est l'acide gras le plus actif contre la plupart des bactéries alors que les acides gras de chaînes C<sub>8</sub> et C<sub>18</sub> sont généralement plus actifs contre les levures et moisissures.

**Les acides gras mono et polyinsaturés :**

Les acides gras monoinsaturés sont généralement plus actifs que les acides gras saturés. L'activité optimale a été montrée pour l'acide palmitoléique (C<sub>16:1</sub>). La présence d'une double liaison augmente l'activité antimicrobienne sans que la position de la liaison sur la chaîne n'ait d'impact. De plus il faut noter que les isomères (*Z*) présentent systématiquement une inhibition plus importante que les composés (*E*). Enfin, les dérivés acétyléniques sont plus actifs contre les champignons que les dérivés éthyléniques (Tableau 7) [67].

**Les acides gras estérifiés :**

L'utilisation des esters méthyliques et éthyliques de ces mêmes acides gras réduit l'activité antimicrobienne. Par contre, les esters d'alcool polyhydrique montrent une bonne activité. Les esters de polyglycérol montrent en particulier d'excellentes propriétés antimicrobiennes, les plus actifs étant les esters de caprate et laurate de polyglycéryle. Parmi les esters de monoglycérol, les caprate et laurate sont également les plus actifs [68]. Enfin, les essais réalisés sur les sucroesters montrent qu'à l'exception

du sucrose laurate, ils sont plus actifs que leurs acides gras correspondants.

**Tableau 7 : Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) en mM d'acides gras saturés et insaturés [67]**

| Acides gras          | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Candida albicans</i> |
|----------------------|------------------------------|-------------------------|
| Caproic (6 :0)       | – <sup>a)</sup>              | –                       |
| Caprylic (8 :0)      | –                            | –                       |
| Capric (10 :0)       | 2,90                         | 2,90                    |
| Lauric (12 :0)       | 2,49                         | 2,49                    |
| Myristic (14 :0)     | 4,37                         | 4,37                    |
| Myristoleic (14 :1)  | 0,44                         | 0,55                    |
| Palmitic (16 :0)     | –                            | –                       |
| Palmitoleic (16 :1)  | 0,98                         | 0,49                    |
| Stearic (18 :0)      | –                            | –                       |
| Oleic (18 :1)        | –                            | –                       |
| Elaidic (18 :1)      | –                            | –                       |
| Linoleic (18 :2)     | –                            | 0,46                    |
| Linolenic (18 :3)    | 1,79                         | –                       |
| Linolelaidic (18 :2) | –                            | –                       |
| Arachidonic (20 :4)  | –                            | –                       |

a) Absence d'inhibition aux concentrations testées (1,0 mg/ml ou 30-60 mmol/L).

De manière générale, il existe une relation structure/activité. Les acides gras utilisés pour estérifier le glycérol déterminent le potentiel biocide de l'ester résultant, à l'exemple de l'ester de monoglycérol laurate. En effet, leur structure spécifique (longueur de chaîne) leur permet de pénétrer et déstabiliser la cellule membranaire des microbes, entraînant la destruction du microorganisme. Enfin, l'activité antimicrobienne de ces molécules peut être améliorée par la diminution du pH, la présence d'un agent chélatant et/ou antioxydant [67,69,70,71].

Ainsi, le marché de la cosmétique se voit proposer depuis quelques années de nombreuses matières premières composées d'esters de monoglycéryl purs ou en mélange, dont les fonctions premières sont les propriétés émulsifiantes et hydratantes

mais dont l'activité antimicrobienne est largement étudiée (ex : glyceryl caprate, glyceryl caprylate, glyceryl laurate). Ces matières premières ne sont donc pas déclarées en conservateurs. Leur grand avantage est qu'elles présentent une activité optimum sur une échelle de pH allant de 4,5 à 7, ce qui est largement compatible avec les contraintes cosmétiques. Leur activité étant généralement meilleure contre les bactéries et levures que contre les moisissures, il peut être avantageux de les combiner à un acide organique [46,16].

- Agents chélatants

Les agents chélatants ou séquestrants sont des molécules qui permettent entre autres de maintenir la transparence d'une formule, de protéger les parfums, de stabiliser les agents épaississants, de prévenir le rancissement et de stabiliser les colorants.

Ils ont également la capacité d'augmenter l'efficacité antimicrobienne contre les bactéries à Gram négatif, les levures et moisissures. Ils sont particulièrement efficaces contre *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas aeruginosa* (bactéries à Gram négatif). Les agents chélatants que l'industrie cosmétique utilise sont, par exemple, l'EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique), le calcium disodium EDTA, l'acide citrique, le citrate de sodium, le citrate de potassium, le trisodium phosphate.

La contribution de l'EDTA à l'activité antimicrobienne a été très étudiée. Cette molécule provoque la dissolution des couches externes des membranes des bactéries à Gram négatif. Ceci a pour conséquence la libération de solutés intracellulaires ainsi qu'une solubilisation partielle de l'enveloppe cellulaire des bactéries. Grâce à cette action, la perméabilité des cellules bactériennes est augmentée, ce qui les rend plus vulnérables à l'action d'autres agents de conservation. En effet, la complexité de la structure des membranes cellulaires des bactéries à Gram négatif les rend plus résistantes que celles à Gram positif et souvent difficiles à combattre. Néanmoins, bien que très efficace contre *P. aeruginosa*, l'action de l'EDTA contre cette bactérie n'est pas complète s'il est utilisé comme seul agent antibactérien. Différents travaux ont montré une synergie très importante entre l'EDTA et de nombreux conservateurs usuels en cosmétique contre *P. aeruginosa*. Des études ont également montré le potentiel de l'EDTA pour avoir un effet synergique avec des conservateurs naturels tels que des huiles essentielles ou des extraits végétaux [72,73,74,75,76,77]. Néanmoins, l'utilisation de cet agent chélatant est controversée. Il se révèle en effet cytotoxique et légèrement génotoxique sur l'animal. Le principal inconvénient réside néanmoins dans sa persistance dans l'environnement et dans les eaux traitées. La recherche d'alternatives à cet agent efficace est donc d'actualité [78].

- Alcools

Les alcools aliphatiques les plus fréquents dans l'industrie cosmétique sont l'éthanol, l'alcool *n*-propylique et l'alcool isopropylique. Plus la masse moléculaire et la longueur de chaîne augmentent et plus l'efficacité antimicrobienne est accrue. Lorsqu'un produit

fini contient une concentration en alcool supérieure à 20 % en masse volumique, il est auto-conservé et ne nécessite pas d'essais microbiologiques (Tableau 8). En effet, l'alcool (agent chaotropique) déstabilise les cellules membranaires, dénature les protéines et tue les microorganismes lorsqu'il est introduit en quantité suffisante.

En concentration inférieure à 20 %, l'alcool contribue à la conservation, ce qui permet de diminuer la quantité de conservateur à introduire, ou il faut alors combiner son effet à d'autres facteurs physicochimiques tels que le pH (NF EN ISO 29621) [47,62].

**Tableau 8 : concentrations minimales d'éthanol permettant l'inhibition des microorganismes**

| Microorganismes | Concentration d'Ethanol<br>(en volume) |
|-----------------|--|
| Bactéries       | 8-11 %                                 |
| Levures         | 8-11 %                                 |
| Moisissures     | 15-18 %                                |

Cependant, il ne faut pas oublier que l'alcool est asséchant et irritant pour les peaux sensibles, ce qui peut limiter son utilisation à des concentrations trop élevées [46].

#### 3.1.1.3.3 L'eau

L'eau est une matière première utilisée en très grande quantité dans une grande partie des produits cosmétiques. Plusieurs types d'eaux sont utilisés : l'eau adoucie, l'eau déminéralisée et l'eau stérile.

L'eau stérile est à la fois déminéralisée et débarrassée de tous les microorganismes. Pour cela, on peut utiliser deux grands procédés :

- La distillation (eau distillée),
- La filtration sur des membranes de cellulose spéciales de très faible porosité (0,22  $\mu\text{m}$ ).

La distillation est un procédé qui consomme beaucoup d'énergie, c'est donc le procédé de filtration stérilisante qui est généralement préféré.

L'eau étant le milieu de croissance des microorganismes, plus le produit cosmétique en contient, et plus les microorganismes pourront proliférer. Or l'absence de microorganismes dans cette matière première, souvent prédominante en cosmétique, est un facteur clé pour la propreté microbiologique du produit fini. L'utilisation d'une eau stérilisée est donc une alternative qui permet de diminuer la quantité de conservateur à incorporer. En effet, si l'eau contient un certain nombre de microorganismes au moment du procédé de fabrication, le rôle premier du conservateur sera de les éliminer ou de lutter contre leur prolifération avant même que le consommateur n'ouvre son produit, alors que l'utilisation d'une eau stérile évite cette consommation prématurée [46].

#### 3.1.1.3.4 Température

Comme pour le pH, il existe une plage de température optimale à la survie et à la croissance microbienne. Ainsi, à basse température, la croissance se trouvera nettement ralentie et au-delà de la température optimale, les microorganismes sont tués. En fonction de la sensibilité des produits formulés, le facteur température peut donc permettre le contrôle des microorganismes, par exemple en maintenant le produit pendant un intervalle de temps prolongé à une température supérieure à la température optimale (au moins 10 min). Les rouges à lèvres ou fards à joues conditionnés à des températures  $\geq 65,0$  °C remplissent ce dernier critère (NF EN ISO 29621) [46].

#### 3.1.1.4 Autres systèmes de conservation

##### 3.1.1.4.1 Enzyme

Une alternative à la conservation par voie chimique est l'utilisation de systèmes enzymatiques. Les enzymes sont des catalyseurs biologiques. Celles qui luttent contre les mécanismes de défense des organismes vivants sont typiquement des enzymes lytiques ou des enzymes oxydoréductases. La conservation enzymatique est déjà très utilisée par l'industrie laitière pour les produits de péremption rapide. Des études sont menées afin d'optimiser leur potentiel antimicrobien dans le cas de l'industrie cosmétique. Un système conservateur enzymatique breveté à base de lactoperoxydase, de glucose oxydase, de glucose, d'iodure de potassium ainsi que de thiocyanate de potassium existe déjà sous le nom de Biovert® (Arch Personal Care, L.P.) [79,80].

Les avantages du système enzymatique sont les suivants :

- l'enzyme n'est pas consommée après avoir agi contre la cellule cible. Une enzyme reste active tant qu'elle se trouve en présence de son substrat,
- le principe est basé sur les systèmes de défenses immunitaires naturelles.

Ses inconvénients sont le prix (environ 20 fois plus cher qu'un système conservateur de synthèse classique), la difficulté de production à grande échelle et une sensibilité à la chaleur. Les produits conservés *via* un complexe enzymatique ne doivent pas être exposés à des températures au-delà de 35 °C pendant une durée prolongée au cours de la production ou pendant le stockage [46,81].

##### 3.1.1.4.2 Procédés de stérilisation

###### ▪ UHT

Le principe de la stérilisation à Ultra Haute Température est une technique brevetée par les laboratoires Dermatherm [82]. Déjà très utilisée en agroalimentaire, notamment pour le lait, la stérilisation se fait par un passage rapide à haute température (135 °C pendant 3 à 7 secondes) suivi d'un refroidissement immédiat. La quasi-totalité des microorganismes est ainsi éliminée. Le procédé de stérilisation est effectué directement après production sur les produits non conditionnés (vracs) dans des packagings de type



« airless » munis en plus d'un bouchon antimicrobien, avant d'être conditionnés en bloc stérile [46]. Le packaging « airless » protège de la lumière et de l'air. Le bouchon antimicrobien est garni d'une mousse antimicrobienne qui nettoie et protège la valve à chaque repositionnement du bouchon. Ce procédé n'est bien sûr pas applicable à tous les produits cosmétiques. En particulier, il est réservé aux cosmétiques fluides.

- Rayons

Comme décrit ci-après (cf 3.1.2), il existe des procédés de stérilisation aux rayons gamma, bêta ou au gaz d'oxyde d'éthylène qui stérilisent le produit cosmétique fini, avant ou après conditionnement.

- CO<sub>2</sub> supercritique

Une technique de stérilisation plus récente est l'utilisation du CO<sub>2</sub> supercritique. En effet, à pression atmosphérique, le CO<sub>2</sub> inhibe la croissance microbienne, mais le phénomène est réversible. Par contre, lorsque la pression augmente, l'effet du CO<sub>2</sub> sur les microorganismes augmente et devient irréversible. L'effet du CO<sub>2</sub> supercritique sur les microorganismes dépend de plusieurs paramètres tels que la nature des microorganismes, l'activité de l'eau du milieu, le pH, la température. Le mode d'action du CO<sub>2</sub> n'est pas encore clairement défini. Il a été montré que lors d'un traitement au CO<sub>2</sub> supercritique, la mort cellulaire a lieu pendant la dépressurisation. En effet, le CO<sub>2</sub> supercritique a la capacité de diffuser dans les cellules microbiennes [83]. Ainsi, plusieurs hypothèses ont été émises sur son mode d'action:

- La nature lipophile du CO<sub>2</sub> supercritique solubilise les bicouches de phospholipides de la membrane cellulaire, augmentant fortement la perméabilité de celle-ci,
- Rupture de la cellule à cause de la pression interne,
- Inactivation d'enzymes nécessaire à la métabolisation des cellules,
- Diminution du pH cytoplasmique par accumulation du CO<sub>2</sub> dans le cytoplasme interne des cellules, formation de protons en grande quantité et incapacité des cellules à tout expulser pour réguler le pH,
- Conversion du bicarbonate formé en carbonate, entraînant une précipitation intracellulaire de sels.

Ainsi, un certain nombre de points reste à élucider sur la méthode de stérilisation au CO<sub>2</sub> supercritique. Néanmoins, ses excellentes propriétés microbicides ainsi que le respect environnemental de la technique laissent présager un intérêt croissant pour cette alternative [84,85,86,87,88].

### 3.1.2 De la fabrication au packaging

#### 3.1.2.1 BPF

L'hygiène des locaux est primordiale et facilitée par des surfaces lisses et non absorbantes. Il faut particulièrement veiller aux tuyauteries apparentes et difficiles à atteindre, aux courants d'air, au taux d'humidité ainsi qu'aux eaux stagnantes qui peuvent devenir des sources de contamination. Il est nécessaire de privilégier des matériaux de fabrication en acier inoxydable. Un choix judicieux des tuyauteries et robinetteries, à nombre limité de coudes par exemple, limitera les risques. Afin d'optimiser les décontaminations, les nettoyages à l'aide de détergents germicides (bactéricides et fongicides) sont à privilégier [89].

Le personnel opérant doit également porter une tenue adaptée et répondre à des normes d'hygiène strictes afin de véhiculer un minimum d'agents contaminants [14].

Les matières premières utilisées dans la fabrication des produits peuvent contenir des microorganismes et contaminer le produit *in situ*. L'eau est ainsi la source première de contamination et sa propreté microbiologique doit être scrupuleusement vérifiée. De plus, des produits d'origine végétale tels que les poudres végétales, les extraits, les gommes, les alginates,... ou encore d'origine tellurique telles que les argiles, mais également certains colorants, agents de surface,... peuvent être porteurs de germes et contaminer le produit fini. Il est donc nécessaire que les tests de contrôle de la qualité microbiologique de ces ingrédients soient rigoureusement appliqués [14]

#### 3.1.2.2 Packaging

Le choix du packaging est d'une importance cruciale lorsque le souhait du fabricant est d'optimiser la conservation du produit fini. En effet, une fois fabriqué et conditionné, les sources de contaminations majeures d'un produit sont les contacts répétés entre le produit et le doigt du consommateur, l'air et l'eau. De même, une température de conservation élevée (par exemple dans les salles de bains) pourra favoriser la multiplication des germes. La contamination peut avoir lieu alors que le consommateur prélève le produit dans le tube ou le pot, packaging nécessitant un contact direct du produit avec l'air et avec le doigt de l'utilisateur, chargé de microorganismes.

Ainsi, des packagings spécifiques ont été élaborés afin de limiter au maximum la pénétration des microorganismes dans le contenant.

De nombreux packaging permettent de protéger, avec plus ou moins d'efficacité, le produit fini de la contamination microbienne avant et après ouverture. Les pompes « airless » ou encore certains dispositifs de fermeture spécifique développés par des laboratoires dermatologiques comme Avène®, sont des solutions proposées aux industriels et qui ont pour but de limiter, voire d'empêcher, tout contact entre le produit et le consommateur, et entre le produit et l'environnement extérieur au packaging. L'objectif est également de bloquer l'entrée d'eau et d'oxygène à l'intérieur du packaging [46,90,51,17,91].

Les packagings mono-doses sont une autre solution. En effet, dans le cadre de l'utilisation unique, il n'y a pas de contamination extérieure du produit. Ainsi, le formulateur peut diminuer, voire supprimer, la quantité de conservateur à incorporer dans le produit. Des fabricants de contenants mono-doses proposent par exemple des packagings ayant subi une étape de stérilisation. Différents processus de stérilisation sont envisageables.

- Stérilisation ETO : oxyde d'éthylène (gaz) aux propriétés bactéricides, fongicides, sporicides et virucides. Il est mélangé à de l'azote ou du dioxyde de carbone. Il s'infiltre dans l'emballage et au cœur du produit, détruisant ainsi les microorganismes
- Stérilisation aux rayons gamma
- Stérilisation aux rayons bêta

Bien que l'option de la mono-dose stérile soit séduisante pour qui souhaite éliminer complètement les conservateurs, l'un des inconvénients majeurs est la quantité de packagings, qui se trouve décuplée pour un volume de produit donné par rapport aux multi-doses. Or dans une société où les contraintes de développement durable sont de plus en plus exigeantes, l'usage unique semble sortir de ces considérations [46].

#### 3.1.2.3 Matériaux

Les matériaux constituant le packaging ont un rôle primordial dans l'optimisation de la conservation d'un produit cosmétique. En effet, certains conservateurs sont par exemple sensibles à la lumière (oxydation). C'est le cas de l'alcool benzylique, du sorbate de potassium, ou encore de l'acide sorbique. Les formules contenant ce type de conservateurs devront être conditionnées dans des packagings tenant compte de ce facteur.

Certains plastifiants tels que les phtalates d'alkyles présents en grande quantité dans le Chlorure de PolyVinyle souple (PVC) sont connus pour migrer lentement du packaging dans la formule. Ils sont alors capables d'inactiver les conservateurs phénoliques. Les polyuréthanes peuvent, quant à eux, diminuer l'activité des conservateurs phénoliques et des ammoniums quaternaires. Il est également connu que l'alcool benzylique interagit avec le polyéthylène (PE) et le polystyrène (PS). Les acides sorbique et déhydroacétique sont instables dans des contenants en verre brun, en PVC et en polypropylène (PP) [92].

Alors que la tendance actuelle dans la conception des packagings est d'avoir recours à des matériaux d'origine naturelle et biodégradables ou recyclables, leur impact sur la conservation demeure préoccupant. En effet, les matériaux dérivés de fibres organiques ou les polymères d'origine naturelle constituant certains de ces contenants, peuvent avoir un impact important sur les interactions packaging/produit et entraîner l'inactivation d'une partie du système conservateur.

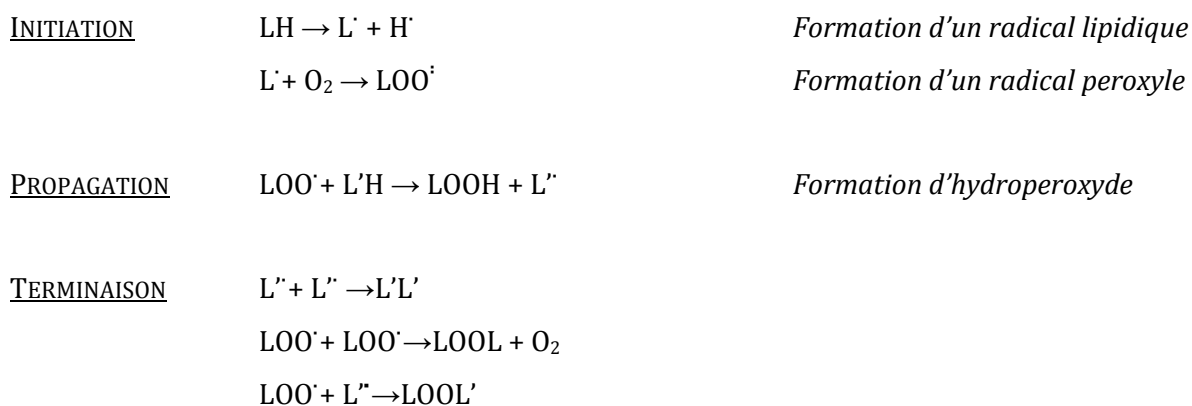
Il est donc nécessaire que le fabricant prenne en compte la nature des conservateurs et du packaging lors de l'optimisation de la conservation de produit fini [46,90,93].

## 4 LES ANTIOXYDANTS

Pour la cosmétique, les antioxydants sont des réducteurs ayant la capacité d'interrompre la réaction de peroxydation et ainsi d'empêcher la formation d'hydroperoxydes et de peroxydes, courante pour les huiles insaturées. Ils sont utilisés dans toutes les formules contenant des corps gras insaturés, mais peuvent également être incorporés à des phases aqueuses contenant des extraits végétaux riches en oxydases, enzymes catalysant la réduction de l'oxygène en eau ou en peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ .

Leur concentration dans les produits cosmétiques est généralement comprise entre 0,02 et 0,05 % [94].

L'oxydation générant bien souvent un phénomène de rancissement à proscrire en cosmétique, il est donc important de connaître la sensibilité des matières premières et produits finis cosmétiques à ce phénomène ainsi que les facteurs qui en sont responsables.



*L = Lipide*

**Figure 1 : schéma général du mécanisme d'auto-oxydation**

Les phénomènes d'oxydation apparaissent selon plusieurs mécanismes dans les produits cosmétiques :

- L'autooxydation (qui peut être catalysée par la température, les ions métalliques ou les radicaux libres) (Figure 1) ;
- La photooxydation (initiée par la lumière en présence de photosensibilisants) (Figure 2).

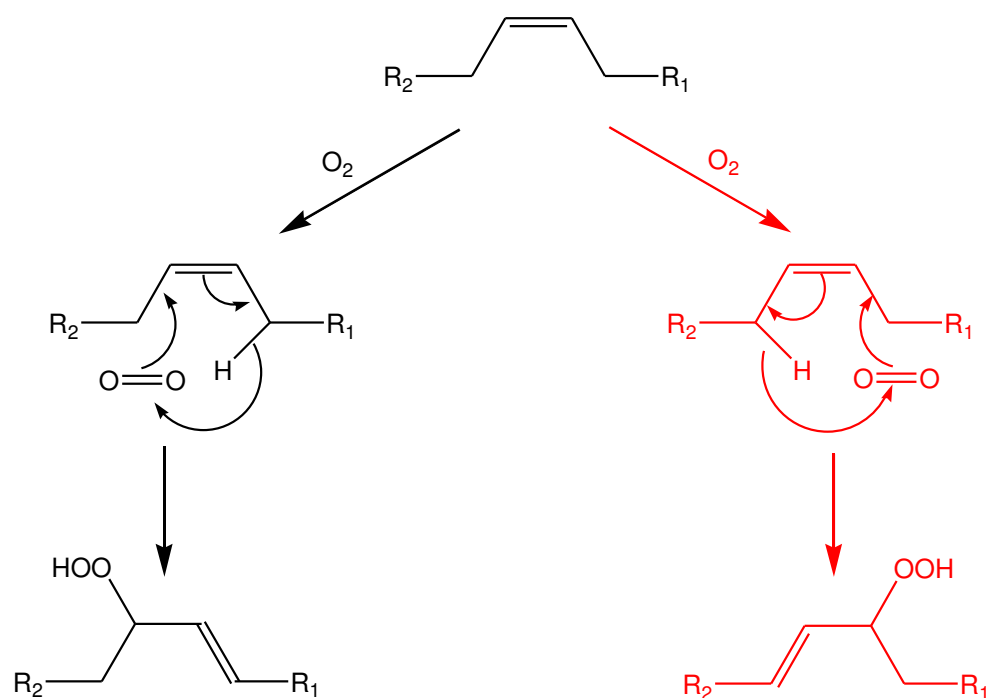


Figure 2 : formation d'hydroperoxydes par photo-oxydation des acides gras insaturés

Les tocophérols, naturellement présents dans les huiles végétales, notamment l' $\alpha$ -tocophérol, sont fréquemment formulés en cosmétique, tout comme les antioxydants phénoliques – très présents dans les extraits végétaux [95].

On peut également recourir aux antioxydants sous forme de complexe ou en association avec un chélateur de métaux. Un phénomène de synergie peut être observé lorsqu'un des accepteurs de radicaux libres possède une efficacité supérieure à un autre issu du même complexe. Cette synergie permet au complexe antioxydant d'avoir une réactivité supérieure à celle d'un composé utilisé seul. L'acide ascorbique, hydrosoluble, et son dérivé lipophile, le palmitate d'ascorbyle, sont souvent employés comme antioxydants synergistes. L'acide citrique ou l'EDTA sont utilisés comme chélateurs de métaux [96]. L'association de l'acide citrique avec du tocophérol, ou encore du  $\beta$ -carotène et de l' $\alpha$ -tocophérol, sont de bons exemples de complexes antioxydants synergiques ayant montré leur efficacité [96,97].

L'efficacité des antioxydants dans les systèmes lipidiques dépend de trois paramètres : leur solubilité, leur volatilité et leur stabilité. En effet, les antioxydants doivent être liposolubles afin de pouvoir réagir avec les radicaux libres issus de l'oxydation des huiles. Par ailleurs, ils ne doivent pas être trop volatils au risque d'être perdus lors du processus de fabrication du produit fini. Ils doivent également être stables à la température mise en œuvre lors de la production. Il est nécessaire que les antioxydants soient ajoutés avant que les réactions d'oxydation n'interviennent car, s'ils préviennent ce phénomène, ils n'ont aucune action sur les produits de l'oxydation.

## 5 MICROBIOLOGIE

Comme le rappelle la Figure 3, le contrôle et la maîtrise de la microbiologie des produits cosmétiques sont nécessaires et par ailleurs imposés par la réglementation.

### **La microbiologie en cosmétique**

Les produits cosmétiques étant destinés à être mis en contact avec différentes parties du corps, il se doit d'être sûr d'un point de vue microbiologique. Plus précisément, ils ne doivent pas contenir de microorganismes susceptibles de nuire à l'utilisateur, que ce soit par leur nature ou leur concentration.

La réglementation cosmétique définit donc la quantité maximale de microorganismes pouvant être présents dans les produits finis, ainsi que ceux qui ne doivent pas être détectés. Cette première norme permet d'assurer que le produit fini ne présente pas de risque microbiologique dû à une contamination de fabrication notamment.

Seulement, les microorganismes font partie de notre environnement. Or, les produits cosmétiques sont pour la plupart destinés à être utilisés sur des périodes de plusieurs mois. Donc, il faut également s'assurer que les produits mis sur le marché sont capables de résister aux développements de microorganismes initialement présents ou involontairement inoculés par le consommateur. A cette fin, un test appelé 'challenge test' a été instauré afin d'évaluer la résistance des produits face à une inoculation volontaire et contrôlée de microorganismes.

Ces différentes facettes bien définies par la réglementation cosmétique assurent la mise sur la marché de produits microbiologiquement sûrs pour le consommateur.

Figure 3 : encart rappelant la nécessité des contrôles microbiologiques des produits cosmétiques [46].

Le développement d'un nouveau conservateur nécessite plusieurs étapes d'évaluation et de validation microbiologique. Le secteur d'application et sa réglementation orientent le choix des microorganismes à utiliser pour réaliser les essais.

- Tests d'activité antimicrobienne et challenge test

L'annexe I du règlement CE 1223/2009 du parlement européen pour la cosmétique précise que le rapport de sécurité du produit doit comporter les spécifications microbiologiques dudit produit ainsi que les résultats du challenge test pour la conservation. Le challenge test est un test réglementé permettant d'évaluer l'efficacité du système conservateur.

### **Analyse microbiologique du produit**

Afin de déterminer quels sont les produits nécessitant une analyse microbiologique en vue d'une détection de microorganismes spécifiés et non spécifiés, il est conseillé aux industriels d'effectuer une analyse du risque microbiologique selon la norme NF EN ISO 29621 de juin 2011. En effet, les produits présentant un faible risque microbiologique ne nécessitent pas la mise en œuvre des normes internationales de microbiologie relatives aux cosmétiques. On peut citer par exemple les produits défrisants qui présentent un  $\text{pH} \geq 10,0$  ou encore les vernis à ongles à base de solvants.

Une attention particulière doit être accordée aux produits cosmétiques utilisés sur le

contour des yeux, sur les muqueuses en général, sur une peau lésée, chez les enfants de moins de trois ans, chez les personnes âgées et chez les personnes au système immunitaire fragilisé. Ces produits sont dits de catégorie 1, les autres étant dits de catégorie 2. Ces produits doivent répondre aux contraintes suivantes (en Europe) :

- **Catégorie 1 :** le nombre total de microorganismes mésophiles aérobies (microorganismes pouvant se développer à des températures entre 20 et 45 °C, en présence d'oxygène atmosphérique [98]) acceptable ne doit pas excéder  $10^2$  CFU/g (Unité Formant Colonie) ou  $10^2$  CFU/mL dans 0,5 g ou 0,5 mL de produit (limite maximale acceptable  $5 \cdot 10^2$  CFU/mL).

- **Catégorie 2 :** le nombre total de microorganismes mésophiles aérobies acceptable ne doit pas excéder  $10^3$  CFU/g ou  $10^3$  CFU/mL dans 0,1 g ou 0,1 mL de produit (limite maximale acceptable  $5 \cdot 10^3$  CFU/mL) [99].

*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* sont les souches pathogènes à risque dans les produits topiques car elles peuvent engendrer des infections cutanées ou ophtalmologiques. Elles ne doivent donc pas être détectées dans 0,5 g ou mL de produits de catégorie 1, ni dans 0,1 g ou mL de produits de catégorie 2. La détection d'autres sortes de microorganismes (par exemple des indications de contamination fécale tels qu'*Escherichia coli*) peut aussi s'avérer nécessaire car leur présence laisse penser à une défaillance de l'hygiène au cours du processus de fabrication.

Ainsi, la qualité microbiologique des produits fabriqués doit être évaluée tout au long de la chaîne de fabrication, de la matière première au produit fini, en passant par l'environnement de production.

Afin d'effectuer ces examens microbiologiques au sein du laboratoire, certaines contraintes sont à respecter pour la viabilité du test :

- Toute contamination de l'échantillon à tester doit être évitée, celle-ci pouvant avoir lieu lors du transport, de la réception, du stockage ou de la manipulation de l'échantillon ;

- L'inhibition potentielle de la croissance microbienne par l'échantillon doit être neutralisée avant le début du test de recherche ou du dénombrement des microorganismes viables dans le produit [100].

Les laboratoires de contrôle de la propreté microbiologique de produits cosmétiques doivent être en possession d'un équipement de stérilisation adéquat pour le matériel, les milieux de culture et les réactifs (stérilisation par chaleur sèche, humide et filtration) et de hottes microbiologiques (hotte à flux laminaire ou de sécurité) afin de pouvoir manipuler dans des conditions de sûreté et de rigueur optimales [101].

Le laboratoire effectuant les tests possède une certaine liberté quant au choix de la préparation des échantillons, plus particulièrement la préparation des milieux de culture. Il est possible de préparer entièrement les milieux selon des compositions décrites dans les normes AFNOR pour le contrôle microbiologique des cosmétiques. Il

est également possible d'utiliser des milieux de culture déshydratés conformément aux instructions du fabricant ou encore des milieux prêts à l'emploi.

### Challenge Test

Différentes normes définissent un test d'efficacité de la conservation antimicrobienne ou challenge test :

- NF T 75 611:2007 : Cosmétiques – Microbiologie – Évaluation de la protection antimicrobienne d'un produit cosmétique (Tableau 9) ;
- Pharmacopée Européenne 7.0 EP 5.1.3 : Efficacité de la conservation antimicrobienne ;
- Pharmacopée US - USP 51: Preservative Efficacy Testing and Preservative Challenge Testing by Antimicrobial Test.

Le challenge test permet de tester le comportement d'une formulation cosmétique face à une contamination volontaire et artificielle par des microorganismes de référence afin que les produits mis à disposition du consommateur ne présentent pas de risque particulier. Les microorganismes de test sont inoculés en quantité déterminée puis l'évolution de la population viable est suivie par dénombrement des germes dans des échantillons prélevés à intervalles de temps donnés (en général à J2, J7, J14 et J28). La température et la durée des essais sont contrôlées.

Cet essai d'efficacité de conservation doit être effectué :

- À la conception du produit pour sélectionner le système le plus efficace,
- Lors de l'étude de stabilité, afin de s'assurer de son efficacité à la date de péremption du produit,
- À chaque changement d'un élément de la formulation ou du conditionnement.

Les essais doivent être menés en utilisant comme organismes de test les souches suivantes :

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (souches équivalentes : CIP 82.118, NCIMB 8626, NBRC 13275, KCTC 2513) ;
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (souches équivalentes : CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMN 9518, NBRC 13276, KCTC 1916) ;
- *Escherichia coli* ATCC 8739 (souches équivalentes : CIP 53.126, NCIMB 8545, NBRC 3972, KCTC 2571, NCTC 8545) ;
- *Candida albicans* ATCC 10231 (souches équivalentes : IP 48.72, NCPF 3179, NBRC 1594, KCTC 17205) ;
- *Aspergillus niger* / *brasiliensis* ATCC 16404 (souches équivalentes : IP 1431.83, IMI 149007, NBRC 9455, KCTC 6317) ;

La Pharmacopée européenne 5.1.3 (01/2011: 50103) recommande de tester *Escherichia coli* pour les préparations orales.



Avant tout challenge test, la qualité microbiologique du produit doit être déterminée car une flore initialement présente dans le produit interférera avec les résultats de l'essai.

Selon les résultats du test, deux profils de produits sont définis selon le Tableau 9 (inspiré de la norme NF T 75 611:2007). Un produit de profil A satisfait aux exigences de protection antimicrobienne. S'il répond aux critères du profil B, des éléments de l'analyse de risques doivent justifier un niveau de maîtrise du risque microbiologique conforme (conditionnement, pH, activité de l'eau ( $a_w$ )...). Si la formule ne correspond pas aux profils A ou B, le responsable de la mise sur le marché du produit devra apporter les arguments de maîtrise renforcée du risque microbiologique du produit.

Il est à noter qu'en fonction de la norme appliquée (AFNOR NF T 75 611:2007, Pharmacopée européenne 7.0 01/2011 :50103 ou USP32-NF27), certaines variantes sont observées dans les critères d'acceptation [96].

**Tableau 9 : critères d'évaluation de l'efficacité antimicrobienne d'un produit cosmétique**

|          | Bactéries      |                  |                    | Levures       |              |        | Moisissures |        |
|----------|----------------|------------------|--------------------|---------------|--------------|--------|-------------|--------|
|          | T 7 j          | T 14 j           | T 28 j             | T 7 j         | T 14 j       | T 28 j | T 14 j      | T 28 j |
| Profil A | $\geq 3\log^d$ | PA <sup>a)</sup> | (PA) <sup>c)</sup> | $\geq 1\log$  | PA           | (PA)   | PA          | PA     |
| Profil B | <sup>b)</sup>  | $\geq 3\log$     | PA                 | <sup>b)</sup> | $\geq 1\log$ | PA     | PA          | PA     |

*a) Pas d'augmentation de la population microbienne par rapport au temps précédent*

*b) Cases comportant un critère correspondant à des déterminations facultatives*

*c) Les critères entre parenthèses sont à considérer comme informatifs*

*d) Réduction du nombre de microorganismes viables*

## 6 CONCLUSION

Dans le cadre du développement d'un produit cosmétique, il est primordial de définir au préalable quel mode de conservation sera privilégié. Dès le départ, il est nécessaire de prévoir la mise à l'échelle, les conditions de fabrication, le packaging. Suivant ces critères, plus ou moins de solutions seront envisageables. Les solutions les plus simples et les moins contraignantes sont l'utilisation des conservateurs de synthèses présentés dans l'annexe V de la réglementation cosmétique. Mais de plus en plus d'industriels privilégient aujourd'hui les alternatives en utilisant notamment des matières premières aux propriétés antimicrobiennes notoires. Encore peu de solutions naturelles et efficaces sur les 5 souches microbiennes testées lors du challenge test sont disponibles sur le marché. Alors que les huiles essentielles sont très étudiées pour ce potentiel d'activité, les extraits aux solvants restent peu valorisés.

De plus, bien que de nombreux facteurs soient connus pour influencer l'activité de l'eau et ainsi affecter les développements microbiens, le nombre de données précises permettant au formulateur de développer un produit maîtrisé par ce facteur d'autoconservation est extrêmement limité.

## PARTIE II : ENCAPSULATION

L'encapsulation est une technique qui consiste à piéger ou enrober une substance ou un mélange de substances spécifiques à l'aide de matériaux adaptés [107]. Les substances à encapsuler peuvent être liquides, solides ou gazeuses [102,103]. Ce sont souvent des principes actifs sensibles ou instables à certains facteurs environnementaux ayant une action ciblée (vectorisation), ou bien des substances dont on souhaite modifier l'état (transformation d'un liquide en solide par exemple)[104].

Les matériaux enrobants, quant à eux, sont essentiellement des polymères d'origine naturelle ou synthétique, ou des lipides, mais parfois également d'autres molécules. Les particules obtenues présentent deux types de morphologie :

- Soit une capsule, c'est-à-dire une particule réservoir constituée d'un cœur de matière active liquide (plus ou moins visqueux) ou solide, entouré d'une paroi solide continue de matériau enrobant ;
- Soit une sphère, c'est-à-dire une particule constituée d'un réseau polymérique ou lipidique continu formant une matrice dans laquelle se trouve finement dispersée la matière active à l'état de molécules, de fines particules solides, ou encore de gouttelettes de solution [105].

C'est dans les années 50 qu'ont été développés les premiers produits encapsulés, avec la fabrication du papier copie sans carbone, sur lequel était fixé des microcapsules contenant de l'encre. Sous l'effet d'une pression, les capsules s'ouvraient, libérant ainsi les actifs protégés [106,107,108].

Aujourd'hui, les applications de l'encapsulation sont nombreuses et touchent des domaines tels que les industries chimiques, agro-alimentaires, pharmaceutiques, cosmétiques, nutraceutiques, l'agriculture, les textiles ou encore la peinture [107,109,113,123]. Suivant les cas, l'encapsulation a pour objectif d'assurer la protection, la compatibilité et la stabilisation d'une matière active dans une formulation. Elle permet de réaliser une mise en forme adaptée, d'améliorer la présentation d'un produit ou encore de masquer un goût ou une odeur. Enfin, l'encapsulation peut modifier et maîtriser le profil de libération d'une matière active pour obtenir, par exemple, un effet prolongé ou déclenché (Tableau 10).

Le choix d'un procédé d'encapsulation particulier et du type de formulation aura des conséquences directes sur la morphologie, la taille, la structure des microparticules, ou encore sur la teneur en matière active, la stabilité et sur le profil de libération de l'actif [105,113].

Typiquement, la matière active à protéger est une molécule unique. Chaque molécule à encapsuler exige un développement nouveau et spécifique. En effet, il n'existe pas de système universel permettant d'encapsuler toutes sortes d'actifs. Dans le cas où la matière active à protéger est un complexe de molécules, tels que le sont les extraits naturels, les contraintes et difficultés de développements se trouvent accrues. La nature

très variée des différents composés (hydrophilie/hydrophobicité, différences de masse moléculaires, fonctions chimiques diverses...) crée des différences d'interaction avec le ou les matériaux de recouvrement, générant par exemple des rendements d'encapsulation ou des cinétiques de fuites hétérogènes.

Un aperçu général de l'encapsulation spécifique à la cosmétique ainsi qu'un descriptif des techniques d'encapsulation les plus connues, de leurs principes et caractéristiques permettront de comprendre le choix réalisé (Tableau 13).

**Tableau 10 : exemples d'application de l'encapsulation**

| Domaine d'application | Objectifs   | Exemples   | Références        |
|-----------------------|---|--|-------------------|
| Cosmétique            | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Visuel et marketing avec une libération de l'actif à l'utilisation (millicapsules)</li> <li>- Libération retardée et activité optimisée de l'actif encapsulé (microcapsules)</li> <li>- Optimisation de la solubilité des actifs</li> <li>- Protection d'actifs sensibles (température, air, incompatibilité avec d'autres actifs...)</li> </ul> | Encapsulation de vitamines sensibles à l'oxydation   | [110,111,112]     |
| Pharmaceutique        | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Libération contrôlée et ciblée des principes actifs</li> <li>- Protection des principes actifs instables et libération ciblée</li> <li>- Amélioration de la biodisponibilité</li> </ul>  | <p>Encapsulation de la morphine pour réduire sa concentration locale et prolonger son action</p> <p>Encapsulation de l'aspirine pour masquer le goût et libérer l'actif dans l'environnement intestinal.</p> | [113,114,115]     |
| Peinture              | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Amélioration des propriétés des peintures (propriétés adhésives, luminescence des pigments)</li> <li>- Augmentation de la durée de vie des peintures</li> </ul>  | Encapsulation de biocides pour prolonger la durée de vie des peintures   | [116,117,118,119] |
| Agroalimentaire       | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Encapsulation d'ingrédients se libérant au cours de la consommation</li> </ul>   | Encapsulation d'arômes dans les chewing-gums, protection du sel et du sucre contre l'humidité  | [113,120,121]     |
| Textile               | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Encapsulation d'actifs se libérant lors des frottements entre le vêtement et la peau</li> </ul>  | Encapsulation de répulsifs contre les insectes, d'actifs amincissants  | [123,122]         |
| Agrochimie            | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Amélioration du dépôt et/ou de la pénétration des actifs sur les éléments cibles</li> <li>- Protection des actifs contre une dégradation prématurée</li> </ul>   | Encapsulation de pesticides et insecticides  | [123,124]         |

## 1. L'ENCAPSULATION EN COSMETIQUE

L'encapsulation présente plusieurs intérêts pour l'industrie cosmétique. L'objectif peut être de protéger les propriétés de certains actifs tout au long de la durée de conservation du produit fini. Ces systèmes peuvent par exemple faire office de barrière physico-chimique contre les éléments pro-oxydants tels que les radicaux libres, l'oxygène ou encore les rayons UV [125]. Des actifs qui y sont sensibles sont alors protégés *via* l'encapsulation. L'intérêt peut également être d'optimiser la libération (et donc l'activité) du principe actif par une action ciblée et/ou retardée. Dans une optique de réduction des coûts pour l'industriel, l'encapsulation de parfum ou d'actifs coûteux permet de diminuer les concentrations introduites sans affecter l'efficacité du produit fini. Enfin, la mise sur le marché de nouveaux concepts renforce l'image de l'innovation [115].

La teneur en matière active (ou taux d'encapsulation) peut être très élevée dans les microcapsules, de l'ordre de 85 à 90 % (masse de matière active/masse de microparticules). Au contraire, les teneurs habituellement rencontrées dans les microsphères sont plus faibles, de l'ordre de 20 à 35 %, même si, dans certains cas, on peut atteindre des teneurs de 50 %. En terme de contenance, le système microcapsule est bien sûr beaucoup plus intéressant que la microsphère [126].

## 2. PROCEDES CLASSIQUES D'ENCAPSULATION

L'étendue des domaines d'application de l'encapsulation étant large et diversifiée, nombreuses sont les techniques décrites dans la littérature. Chaque technique d'encapsulation répond à des critères bien définis. Ainsi le choix d'une technique se fera en fonction de la nature de l'actif à encapsuler, de la taille de particule souhaitée, de l'application envisagée (cosmétique, pharmaceutique, agroalimentaire, peinture...), de la vitesse et des conditions de libération prévues, des rendements d'encapsulation nécessaires, mais également des contraintes de fabrication et de coût.

### 2.1. Procédés chimiques

#### 2.1.1. La polymérisation

Deux monomères réactifs sont dissous séparément dans des solvants immiscibles et mélangés afin de former une émulsion H/E (huile dans eau) ou E/H (eau dans huile). Les monomères peuvent alors réagir à l'interface huile/eau formant une membrane polymérique [130,127].

Cette technique d'encapsulation présente un certain nombre de contraintes et limites. L'encapsulation de protéines est problématique car ce type d'actif peut participer à la réaction de polymérisation, modifiant ainsi leur activité biologique. Ensuite, il est

souvent difficile de contrôler la réaction de polymérisation : le rendement et la qualité de la membrane obtenue par polymérisation interfaciale dépendent de nombreux facteurs comme la nature des monomères réactifs, les conditions de réaction, les concentrations en monomères, la température, la qualité du mélange [130,128]. De plus, les étapes de lavage requises pour éliminer les monomères, solvants organiques, tensioactifs et produits secondaires en excès sont très coûteuses. Ces lavages répétés peuvent provoquer une perte en actifs hydrosolubles encapsulés. Enfin, les changements de pH engendrés par la formation d'acide chlorhydrique, sous-produit de la réaction du chlorure d'acide et de l'amine, peuvent dégrader le principe actif [130,129]

## 2.2. Procédés mécaniques

### 2.2.1. *Le spray drying ou séchage par atomisation*

Le spray drying est largement utilisé dans l'industrie agro-alimentaire et pharmaceutique. Cette technique permet, par exemple, de protéger des actifs de l'oxydation et de transformer des liquides en poudres [130,104].

Le principe réside dans le séchage rapide sous air chaud d'un liquide (contenant un certain taux de matière sèche) pulvérisé sous forme de fines gouttelettes afin de générer une poudre. Un polymère hydrophile ou hydrophobe est tout d'abord dissous dans un solvant approprié. Le solvant doit être volatil : c'est en général l'eau avec éventuellement un co-solvant et parfois un solvant organique, mais cela demande une conception particulière de l'appareillage. L'actif, solide ou liquide, est ensuite dissous, suspendu ou émulsifié dans ce solvant. Des ingrédients tels que des tensioactifs, sels, ajusteurs de pH peuvent également être ajoutés afin de faciliter la solubilisation/dispersion des produits ou encore pour agir sur le mécanisme de libération du produit fini. Puis le mélange obtenu est pulvérisé à l'aide d'une buse, d'un disque rotatif ou d'une turbine conduisant à l'obtention de microsphères solides précipitées [130,131]. Parfois, le procédé inclut l'utilisation de plastifiants pour former des microcapsules sphériques régulières et de surface lisse, en réduisant la rigidité des chaînes de polymère [130,132].

Le séchage des gouttelettes permet la formation de particules de taille de 10 à 100  $\mu\text{m}$ , avec un taux d'actif allant jusque 40-50 %. Les matériaux matriciels sont souvent des solutions de polysaccharide (tel que la gomme d'acacia qui est la plus utilisée) sélectionnés pour leur bonne solubilité associée à une faible viscosité [107,133, 134].

### 2.2.2. *Le spray cooling ou prilling (gélification/congélation de gouttes)*

La technologie du spray cooling réside sur le même principe que le spray drying, à ceci près qu'il ne s'agit pas de séchage sous air chaud mais de refroidissement rapide de gouttelettes constituées d'une cire à haut point de fusion. Le principe est donc basé sur la solidification des cires [109]. La matrice d'encapsulation doit avoir un point de fusion très supérieur à la température de l'air de refroidissement ainsi qu'un pic de solidification le plus fin possible. L'actif peut être solide ou liquide, hydrophobe ou

hydrophile. L'ajout d'additif peut faciliter la solubilisation/dispersion des produits, mais également améliorer la solidification, agir sur le mécanisme de libération du produit fini ou encore améliorer la stabilité de la matrice d'encapsulation (ajout d'antioxydant par exemple).

Dans le cas d'un actif hydrophile, la réalisation d'une émulsion à chaud est nécessaire [135,136]. Les huiles choisies sont souvent raffinées et hydrogénées car elles possèdent des points de fusion élevés ainsi que des profils de solidification plus fins. De plus, l'hydrogénation offre une résistance non négligeable à l'oxydation.

Les microsphères obtenues ont une granulométrie qui varie de 100 à 400  $\mu\text{m}$ , avec un taux d'actif pouvant atteindre 40 à 60 %.

### *2.2.3. Le lit d'air fluidisé*

Le procédé d'enrobage en lit fluidisé est une technologie très efficace pour l'enrobage en couche uniforme de particules solides (granulés, cristaux) [104]. Il est également possible d'enrober des matières actives liquides après absorption par des supports particuliers poreux ou en deçà de leur température de solidification.

Ce procédé d'encapsulation se décompose en trois temps :

- Fluidisation de la poudre de particules ;
- Pulvérisation du matériau d'enrobage sur les particules ;
- Séchage de l'enrobage.

La fluidisation consiste à placer une colonne de particules dans un courant d'air ascendant, jusqu'à obtenir une suspension fluide, sans transport significatif des particules. Ces trois opérations se déroulent dans la chambre cylindrique verticale d'un lit fluidisé [107, 105].

Cette technique est avantageuse car une très grande variété de matériaux de recouvrement sont utilisables tels que des polysaccharides, des protéines, des émulsifiants, des matières grasses, des formulations complexes, des enrobages poudres, etc. Cependant, les possibilités de libération sont plus difficilement contrôlables qu'avec d'autres technologies et les chocs entre les particules en cours de procédé peuvent provoquer une agglomération [104]. Les particules obtenues ont une taille pouvant varier de 0,3 à 10 mm [107,137].

### *2.2.4. L'extrusion*

L'encapsulation par extrusion est utilisée quasi exclusivement pour des substances volatiles et instables telles que des arômes dans des matrices d'hydrate de carbone à l'état vitreux [104, 107]. Une méthode classique consiste à mélanger la matière active avec des poudres de polymère thermoplastique. L'ensemble est fondu et extrudé afin de former des tubes filamenteux qui sont refroidis et découpés en cylindres de petite taille (0,5-1,5 mm) puis érodés de manière mécanique afin d'obtenir des objets de formes

sphériques [138]. Cette méthode implique donc que le principe actif soit stable thermiquement à la température d'extrusion qui se situe généralement entre 70 et 150 °C. Il est également possible d'adapter la méthode à basse température afin d'encapsuler des microorganismes et des enzymes dans des matrices spécifiques.

L'un des inconvénients de la méthode est la taille des particules qui demeure assez large (de 200 à 1000 µm), ce qui limite les applications [104, 105].

#### *2.2.5. Rapid Expansion of Supercritical Solutions (RESS) et Aerosol Solvent Extraction System (ASES)*

A l'état supercritique, un fluide possède des propriétés intermédiaires entre celles d'un gaz et celles d'un liquide. Il présente une viscosité et une densité faible ainsi qu'un pouvoir de solvatation, une diffusivité et un taux de transfert de masse élevés [104]. Les fluides supercritiques (FC), en particulier le dioxyde de carbone, sont utilisés depuis quelques années pour l'encapsulation de matériaux sensibles à la chaleur, selon un procédé très similaire au spray drying. L'un des grands avantages de cette méthode est qu'elle permet de s'affranchir de la toxicité des solvants organiques utilisés dans des procédés classiques.

Différents procédés utilisant les FC sont développés :

- Le procédé d'expansion rapide de solutions supercritiques RESS (Rapid Expansion of Supercritical Solutions) ;
- Le procédé d'extraction de solvant d'aérosols ASES (Aerosol Solvent Extraction System) ;
- Le procédé d'enrobage par séparation de phases.

#### *2.2.6. Rapid Expansion of Supercritical Solutions (RESS)*

L'actif ainsi qu'un polymère sont dissous dans le FC à haute pression puis précipités par réduction de la densité du solvant suite à une décompression rapide [130, 139]. La dépression brutale provoque une expansion du FC ce qui entraîne la précipitation du matériau encapsulant et de l'actif sous forme de microsphères [104, 105]. L'un des grands avantages de la méthode est qu'après expansion, le FC est à l'état gaz ; le solide formé est donc pur de tout solvant [130]. De plus l'utilisation de tensioactifs n'est pas requise.

Les limites de la technique sont que le dioxyde de carbone n'a pas de moment dipolaire et présente une faible polarisabilité, ce qui signifie que seuls des matériaux de recouvrement hydrophobes peuvent être dissous dans le dioxyde de carbone. Néanmoins, certains polymères hydrophiles tels que des protéines (gélatine, protéines de blé, etc) et des polysaccharides (celluloses, HPMC<sup>1</sup>, CMC<sup>2</sup>, etc) peuvent gonfler dans le dioxyde de carbone supercritique et donc être utilisés comme matériaux

---

<sup>1</sup> HPMC : Hydroxypropylmethylcellulose

<sup>2</sup> CMC : Carboxymethylcellulose



d'encapsulation [104]. La méthode reste néanmoins réservée à l'utilisation de polymères de faible poids moléculaire.

#### *2.2.7. Aerosol Solvent Extraction System (ASES)*

La méthode est également appelée SAS (Supercritical Antisolvent Crystallization) ou PCA (Precipitation with a Compressed fluid Antisolvent). Tout d'abord, le matériau d'enrobage est dissous dans un solvant organique adéquat. En effet, ce solvant devra être soluble dans le fluide à l'état supercritique. Ensuite, le principe actif est dissous ou dispersé dans cette solution. Puis cette préparation est atomisée dans une colonne dans laquelle circule le FC. Le solvant organique est rapidement extrait par le FC, ce qui provoque la précipitation du matériau d'enrobage ainsi que l'encapsulation de l'actif [105, 130].

Cette technique est plus flexible que la RESS concernant le choix des solvants. De plus, ce procédé autorise l'utilisation de solutions de polymères plus concentrées qu'en RESS ainsi que la mise en suspension de l'actif. Les inconvénients de l'ASES sont la plastification du polymère par le CO<sub>2</sub> ainsi que l'agglomération des polymères de faible température de transition vitreuse [104,130].

### **2.3. Procédés physico-chimiques**

#### *2.3.1. Evaporation/extraction de solvant*

Cette méthode est très utilisée pour préparer des microsphères chargées d'actifs variés et est basée sur l'emploi d'émulsion simple ou double selon le caractère hydrophile ou hydrophobe du principe actif [130]

##### *2.3.1.1. Emulsion simple (H/H ou H/E))*

Le principe actif est dissous dans la phase dispersée constituée le plus souvent d'une solution de polymère dans un solvant organique tel que du dichlorométhane ou de l'acétate d'éthyle. Les polymères synthétiques biodégradables les plus utilisés sont les acides polylactique (PLA) et poly(lactique-co-glycolique). Selon leur poids moléculaire et/ou le ratio copolymérique des polymères, la cinétique de relargage de l'actif sera affectée. Cette solution organique est alors ajoutée à la phase continue qui peut être une huile minérale (huile/huile), ou une solution aqueuse (huile/rau) contenant un émulsifiant. L'ensemble est émulsifié par agitation, homogénéisation ou sonication. Enfin, le solvant organique est éliminé par évaporation ou extraction.

Dans le cas de l'évaporation, le solvant organique volatil pénètre lentement la phase continue puis s'évapore de cette phase à pression atmosphérique, provoquant ainsi un durcissement de l'émulsion formée par précipitation du polymère. Il est possible d'accélérer l'évaporation en faisant le vide ou en augmentant légèrement la température.

L'extraction du solvant organique (plus rapide que l'évaporation) nécessite, quant à lui, le transfert de l'émulsion dans de l'eau ou un autre milieu. Les microsphères obtenues par extraction sont plus poreuses que celles récupérées par évaporation. La porosité accrue implique une libération plus rapide du principe actif. Les microsphères sont récupérées par centrifugation ou filtration puis lyophilisées [130,140,141].

#### 2.3.1.2. *Emulsion double (E/H/E)*

Une solution aqueuse du principe actif est tout d'abord émulsifiée dans une solution de polymère dissous dans un solvant organique. Cette émulsion eau/huile est ensuite ajoutée dans une phase aqueuse contenant un émulsifiant afin de former l'émulsion eau/huile/eau. Enfin, le solvant organique est éliminé par extraction dans la phase aqueuse externe puis évaporé [130].

L'encapsulation par évaporation/extraction de solvant permet d'obtenir des particules de taille contrôlée allant du nano au micromètre. Les rendements sont très variables en fonction de la nature des actifs, des polymères utilisés et du protocole appliqué [140,141].

#### 2.3.2. *La gélation ionotropique*

La gélation ionotropique est basée sur la capacité de réticulation de polyélectrolytes en présence de certains ions pour former des hydrogels. La gélation de l'alginate en présence de calcium est le cas le plus connu. L'alginate est le polyanion le plus utilisé dans le domaine de l'encapsulation. Il est composé d'un enchaînement d'unités d'acides  $\beta$ -D-mannuronique et  $\alpha$ -D-guluronique liées en 1,4. Les cations divalents et trivalents induisent une gélation par liaison des blocs d'unités guluroniques de l'alginate. Les micro- ou macro-sphères sont formées par ajout, goutte à goutte, d'une solution d'alginate et du principe actif dans une solution de chlorure de calcium. Les ions calcium diffusent à l'intérieur des gouttes d'alginate, formant ainsi un réseau tridimensionnel du polyélectrolyte ioniquement réticulé. Il est possible de renforcer la membrane des capsules d'alginate par ajout d'un polyélectrolyte de charge opposée. Par exemple, le chitosane et le poly-L-lysine sont utilisés à cet effet [130,142]. Lorsque le chitosane est utilisé comme polymère gélifiant, la solution aqueuse de réception des microgouttelettes est une solution alcaline qui insolubilise le chitosane [105].

Ce procédé conduit à des microparticules de distribution granulométrique très étroite, dans une gamme de diamètre compris entre 200  $\mu$ m et 800  $\mu$ m. Ces diamètres peuvent être diminués (1-500  $\mu$ m) en utilisant un système de pulvérisation ou encore en passant par un procédé d'émulsion puis de réticulation de la solution d'alginate [130,143,144]. Le taux d'encapsulation reste généralement faible (entre 10 % et 30 % en poids) [105] ;

### 2.3.3. *La coacervation*

La coacervation est basée sur un procédé de séparation de phase d'un ou de plusieurs hydrocolloïdes d'une solution initiale, suivi du dépôt des coacervats ainsi formés autour de l'ingrédient actif en suspension ou émulsifié dans ce même milieu réactionnel. Le coacervat formé peut encapsuler la matière active si les conditions d'étalement des phases en présence sont respectées.

L'enveloppe hydrocolloïdale peut éventuellement être renforcée par l'ajout d'un agent réticulant de nature chimique ou enzymatique approprié. Les plus utilisés sont le formaldéhyde et le glutaraldéhyde [104].

Cette technique produit généralement des capsules de 20 à 800 µm de diamètre qui contiennent 80-90 % de principe actif. Mais il est également possible d'envisager des capsules de taille plus importante [145].

En fonction de la technique de séparation de phase envisagée, on parle de coacervation simple ou complexe.

#### 2.3.3.1. La coacervation simple

La phase continue est composée d'un polymère. La coacervation est provoquée par l'addition d'un non solvant [105,146,147], le changement de température [148,149] et/ou l'ajout d'une solution d'électrolytes [150,151] ou de polymère incompatible [130]. Ce phénomène peut se dérouler en milieu aqueux ou organique. Dans le premier cas, c'est un polymère hydrophile qui formera le coacervat, par exemple la gélatine qui peut être désolvatée par addition de sulfate de sodium. Dans le deuxième cas, c'est un polymère hydrophobe qui sera désolvaté, par exemple l'éthylcellulose. Les particules obtenues sont généralement des microcapsules. Toutefois, dans certains cas, le procédé par coacervation simple permet d'obtenir des microsphères. C'est le cas lorsque la proportion de substance active est faible par rapport au volume du coacervat [105].

Les procédés par coacervation simple nécessitent beaucoup de savoir-faire. Toutefois, lorsqu'une méthode est bien maîtrisée sur le plan de la formulation, elle peut être transposée assez aisément à l'échelle industrielle avec des rendements de production et d'encapsulation élevés [105].

#### 2.3.3.2. La coacervation complexe

La coacervation complexe résulte de l'interaction entre deux polyélectrolytes de charges opposées. La réaction est provoquée par une modification du pH. Les polyélectrolytes doivent être suffisamment chargés pour induire des interactions électrostatiques suffisantes mais pas trop pour ne pas provoquer une précipitation [152,153]. Dans un premier temps, l'actif à encapsuler est dispersé dans une solution aqueuse contenant les deux polymères. Dans un second temps, la coacervation est induite par un ajustement du pH de la solution, de façon à ce que les charges positives du premier polymère

équilibrent les charges négatives du second. L'attraction électrostatique des deux polyélectrolytes provoque l'apparition d'un coacervat mixte. Dans un troisième temps, les gouttelettes de coacervats ainsi formées viennent s'adsorber à la surface de la matière active et former un enrobage continu. Finalement, cet enrobage peut être consolidé par réticulation des macromolécules constitutive du coacervat [108].

Les particules obtenues sont des microcapsules. Leur taille varie de quelques micromètres à quelques centaines de micromètres. Elle dépend essentiellement de la taille initiale des cristaux ou des gouttes dispersés de matière active. Dans ce deuxième cas, la taille des capsules pourra être ajustée en jouant sur la vitesse d'agitation de l'émulsion initiale [154]. Seules les matières actives lipophiles peuvent être encapsulées selon ce procédé : huiles végétales ou minérales, huiles essentielles... Les taux d'encapsulation peuvent être très élevés, de l'ordre de 80 % [155,156,157,158]. Une variante à cette méthode peut être apportée pour encapsuler des matières actives hydrosolubles. Elle consiste à formuler une émulsion inverse eau/huile (E/H) puis à disperser cette émulsion dans la solution aqueuse contenant les polymères. Le coacervat formé par changement du pH vient alors se déposer sur les gouttelettes huileuses. La difficulté de cette approche réside dans la formulation d'une émulsion double eau/huile/eau (E/H/E) stable, condition indispensable à une bonne encapsulation [125,129,159].

#### 2.3.4. Les émulsions

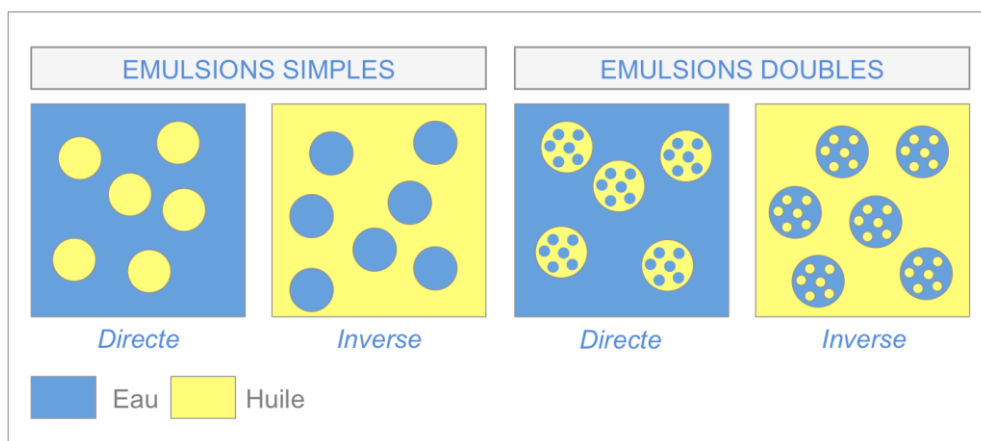


Figure 4 : représentation schématique d'émulsions simples et doubles

Une émulsion est une dispersion colloïdale<sup>3</sup> de deux liquides non ou peu miscibles tels que l'eau et l'huile (Figure 4), à laquelle on ajoute généralement un agent de surface (tensioactif) [160,161]. La dispersion est réalisée par cisaillement de l'une des phases dans l'autre de manière à former des gouttelettes dont la taille peut varier de 10 nm à 10 µm. Les émulsions présentent l'intérêt de solubiliser des actifs tant hydrophiles qu'hydrophobes, tout en étant biocompatibles et suffisamment stables pour les développements étudiés [161].

<sup>3</sup> Dispersion de particules dans une phase continue (liquide dans liquide, solide dans liquide, liquide dans gaz...)

Les émulsions doubles constituent des réservoirs d'intérêt pour une libération retardée d'actifs. Elles consistent en une phase interne émulsifiée dans une seconde phase, elle-même émulsifiée dans une phase externe qui peut être identique ou non à la phase interne. Suivant la nature des phases, on parle d'émulsion de type huile/eau/huile (H/E/H) ou eau/huile/eau (E/H/E) [161].

Plusieurs techniques permettent l'obtention d'émulsions multiples. Parmi elles, les procédés directs, par étapes, par inversion de phases, ou encore par ionisation inverse. Le choix d'une technique plutôt qu'une autre dépendra entre autre de la nature des phases et des agents de surface utilisés.

La rupture des émulsions multiples et la libération du ou des actifs dépendent de plusieurs paramètres :

- La substance active : taille des gouttes dispersées, coefficient de partage eau/huile, pression de vapeur ;
- Les caractéristiques des émulsions : pH, force ionique, viscosité, nature et ramification des agents de surface, taille des gouttes.

La libération se fait donc soit par diffusion à travers la membrane intermédiaire, soit par rupture de celle-ci [162].

L'un des grands avantages de l'encapsulation par les émulsions est la facilité de mise en œuvre à l'échelle industrielle [161].

### *2.3.5. Les systèmes vésiculaires*

Les vésicules sont des microstructures composées d'une ou plusieurs bicouches de tensio-actifs. On distingue vésicules uni- ou multilamellaires, leur taille pouvant varier de 30 nm à quelques microns.

#### 2.3.5.1. Les liposomes

##### 2.3.5.1.1. Définition et classification

C'est dans le milieu des années 60 que Bangham construit les premiers modèles de liposomes, alors définis comme de petites vésicules de phospholipides et utilisés comme modèles des membranes cellulaires [163,164]. Ils sont composés de phospholipides, molécules amphiphiles constituées d'une tête polaire et de deux chaînes hydrocarbonées saturées ou non. Ces molécules peuvent s'organiser en bicouches lamellaires (Figure 5) et former des vésicules colloïdales uni ou multi-lamellaires encapsulant une fraction de phase aqueuse [165]. Les liposomes sont majoritairement composés de glycérophospholipides d'origine naturelle ou synthétique, saturé ou insaturé, ou de sphingolipides. Du cholestérol peut également être ajouté afin d'améliorer la stabilité des structures. Il est aussi possible d'incorporer des composés lipidiques chargés afin de diminuer l'aggrégation des vésicules entre elles.

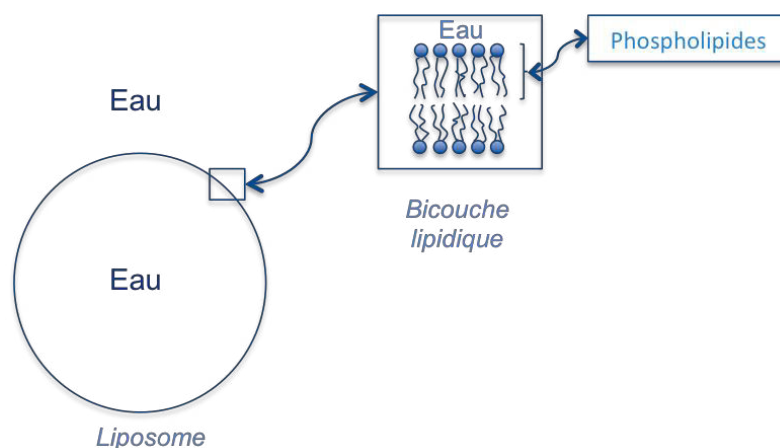


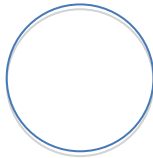



Figure 5 : représentation schématique d'un liposome unilamellaire et de l'organisation de la bicouche lipidique

Comme décrit dans le Tableau 11, les liposomes sont classés en quatre catégories, selon leur mode d'obtention, leur taille ainsi que le nombre de bicouches lipidiques.

Tableau 11 : classification des liposomes [166,167]

| Sigles                       | MLV   | SUV   | LUV  | MVV   |
|------------------------------|---|---|--|---|
| Dénominations                | Multilamellar Vesicles  | Small Unilamellar Vesicles  | Large Unilamellar Vesicles   | Multivesicular Vesicles   |
| Représentations schématiques |  |  |  |  |
| Tailles                      | 400-2000nm  | 20-80nm   | 200-400nm  | >1µm  |

Le type d'application des liposomes va donc varier en fonction des propriétés physico-chimiques que sont la taille, la composition lipidique, la charge de surface et le nombre et la fluidité des bicouches de phospholipides [166]. La première application des liposomes en cosmétique date de 1984 par Louis Vuitton Moët Hennessy et L'Oréal [168].

#### 2.3.5.1.2. Intérêt des liposomes en cosmétiques

Les liposomes multi-lamellaires sont les plus intéressants pour des applications en cosmétique car ils ont une activité propre sur l'épiderme. Leur structure multi-couche permet de reconstituer les feuillet lipidiques intercellulaires après délipidation (perte de lipides) de la peau. Ainsi, on peut prévenir des phénomènes de peau sèche et leur utilisation est recommandée dans le traitement du vieillissement cutané [169]. Cette approche est bien sûre exploitée en cosmétique. Les liposomes ont d'autant plus

d'intérêt qu'ils peuvent véhiculer des substances à effet hydratant, anti-oxydant et autres... Les effets en sont augmentés par rapport aux véhicules plus traditionnels comme les émulsions, grâce aux possibilités de stockage dans la couche cornée [170]. Nous allons donc dans ce qui suit nous focaliser sur les MLV.

#### 2.3.5.1.3. Mode d'obtention

La méthode d'obtention de MLV la plus répandue est la méthode de Bangham [171] dite « d'hydratation du film lipidique ». Selon ce procédé, les phospholipides sont solubilisés dans un solvant organique (ou mélange de solvants) tel que du chloroforme par exemple. Ce solvant est ensuite évaporé, menant à la formation d'un film phospholipidique. Puis ce film est hydraté par ajout d'une solution aqueuse sous agitation afin de former les liposomes. Les actifs hydrophiles sont ajoutés à la phase aqueuse, tandis que les actifs hydrophobes sont incorporés dans le solvant organique [172].

Cette méthode simple présente néanmoins l'inconvénient d'utiliser des solvants organiques. De plus, la formation des liposomes se fait en présence d'un excès de phase aqueuse, ce qui conduit à des rendements d'encapsulation faibles dans le cas des composés hydrophiles.

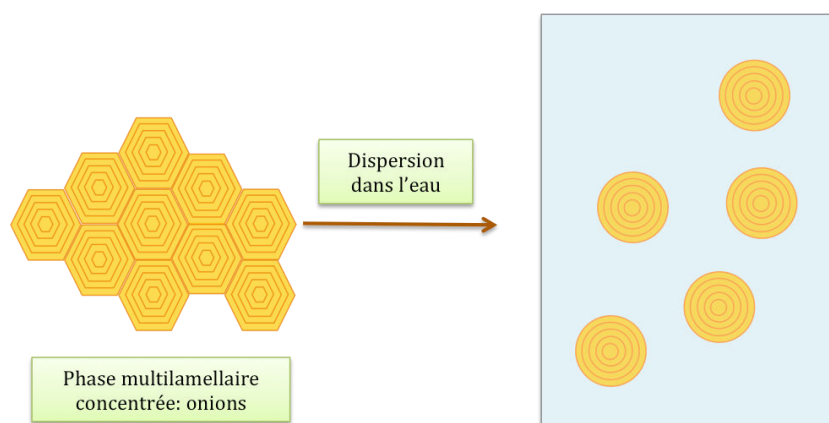
#### 2.3.5.2. Les vésicules multilamellaires types oignons

##### 2.3.5.2.1. Définition et mode d'obtention

La technologie des oignons encore appelés sphérulites® est née de l'étude des phases lamellaires tensioactives sous cisaillement contrôlé. Une phase lamellaire est composée d'un empilement régulier de bicouches de tensioactifs séparées par des couches d'eau : c'est une phase cristal liquide (smectique A). Parfois, un composé supplémentaire, telle qu'une huile, gonfle la bicouche de tensioactifs. Une bicouche est un assemblage organique constitué de deux monocouches où les molécules organiques sont alignées côte à côte. Les têtes hydrophiles sont toutes du même côté et les queues hydrophobes de l'autre. Dans une bicouche, les parties hydrophobes des deux couches se font face tandis que les parties constituées des têtes hydrophiles sont au contact de la phase aqueuse. La distance entre les bicouches est appelée pas lamellaire [173]. Suivant le ratio tensioactif/phase aqueuse, le pas lamellaire varie. Lorsque la quantité de phase aqueuse augmente, le pas lamellaire s'accroît, générant un gonflement des bicouches lamellaires. A partir d'une certaine composition, le pas lamellaire atteint un maximum : la limite de gonflement des bicouches. Toute phase aqueuse ajoutée en plus sera en excès, générant l'apparition d'un système diphasique (phase lamellaire et phase aqueuse en excès) [174,178].

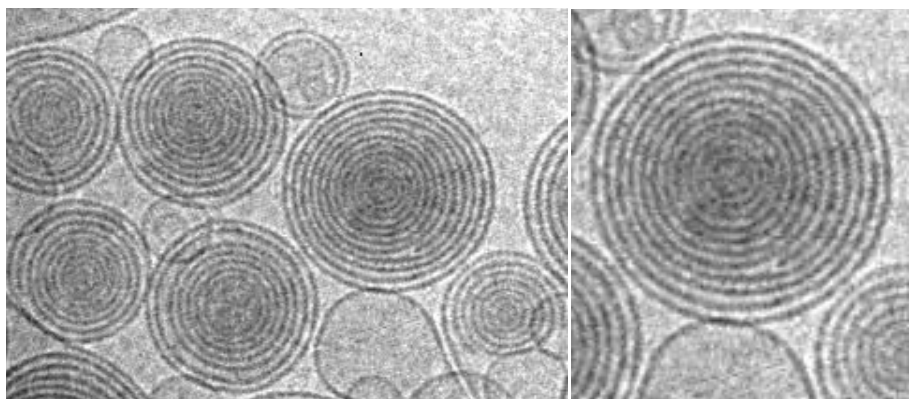
Lorsqu'elle est soumise à un cisaillement, la phase lamellaire monophasique (c'est à dire sans excès aqueux ou encore en limite de gonflement) subit une succession de transformations d'intérêt. En particulier, à une certaine vitesse de cisaillement, les membranes sont rompues et la phase s'organise spontanément en vésicules

multilamellaires de la même taille [113,174]. Après cette étape de cisaillement, les oignons sont au contact les uns des autres, formant une phase compacte. Ils se différencient des MLV « classiques » par leur mode de préparation mais aussi par leur structure ; une succession de bicouches jusqu'au cœur de la vésicule. Ils peuvent alors être dispersés par ajout d'un excès d'eau afin de donner une dispersion colloïdale (Figure 6). En fonction de la formulation (ex : type de tensioactif), et de la vitesse de cisaillement, la taille des vésicules varie entre 0,1 et plus de 50  $\mu\text{m}$ . Les oignons sont capables d'encapsuler une grande quantité de composés hydrophobes au sein des bicouches, ou hydrophiles entre les bicouches lamellaires. Le temps de libération de l'actif dépend en particulier de la taille de la molécule [174].



**Figure 6 : représentation schématique de l'organisation compacte des oignons puis de leur dispersion dans l'eau**

La microscopie électronique à transmission (MET), et notamment la cryo-MET (MET équipé d'un système de préparation d'échantillon par congélation-lyophilisation), permet d'observer ces structures bien spécifiques, comme le montrent les photos Figure 7.

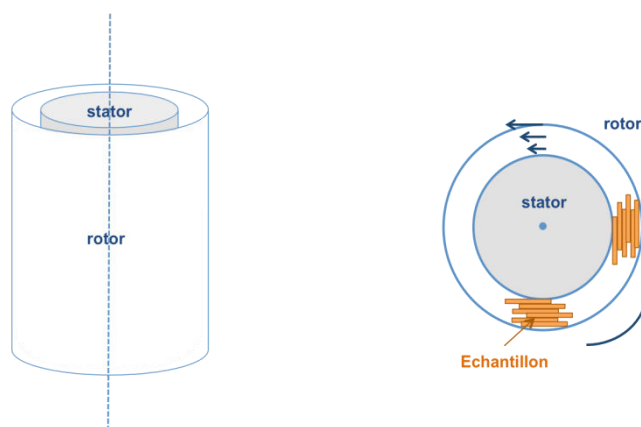


**Figure 7 : observations au Cryo-MET de l'organisation concentrique lamellaire d'oignons.**

L'obtention d'oignons de taille homogène n'est possible que si la phase lamellaire est soumise à un cisaillement constant homogène dans l'espace [175]. L'un des dispositifs qui réunit ces conditions est la cellule dite de Couette, constituée de deux cylindres concentriques en rotation constante l'un par rapport à l'autre, où le cisaillement est défini par le rapport de la vitesse de déplacement relative divisée par la distance entre



les cylindres (Figure 8). Un autre type de dispositif est la cellule de type plan/cône, où un cône dont la pointe est dirigée vers un plan, et dont l'axe est perpendiculaire à ce plan, tourne à une vitesse angulaire constante à distance du plan [175].



**Figure 8 : représentation schématique d'une cellule de couette. L'échantillon est cisaillé entre les parois de deux cylindres coaxiaux. Le cylindre intérieur est fixe alors que le cylindre extérieur tourne à vitesse constante.**

Les vésicules multilamellaires de tensioactifs, en particulier les vésicules à structure en oignon, sont des systèmes qui peuvent encapsuler des actifs, en créant un milieu intérieur différent du milieu extérieur, au sein duquel sont retenus les principes actifs. La rétention de l'actif à l'intérieur de la vésicule a deux origines :

- Thermodynamique : la différence d'affinité de l'actif entre le milieu extérieur et le milieu intérieur entraîne son partage entre les deux milieux.
- Cinétique : Chaque membrane à base de tensioactifs forme une barrière de diffusion qui ralentit le passage et donc la fuite vers l'extérieur de l'actif. Ce mécanisme est d'autant plus efficace que la masse molaire de l'actif augmente, car le coefficient de diffusion sera faible ( $M > 1000 \text{ g/mol}$ )

Le moyen le plus efficace de ralentir la libération de l'actif dans le temps et de jouer sur la cinétique de fuite.

#### 2.3.5.2.2. Intérêt des oignons

Présentant une structure proche des MLV, les oignons possèdent leurs propres caractéristiques :

- Une méthode de préparation ne nécessitant pas de solvant organique ;
- Un taux d'encapsulation élevé ;
- Un arrangement lamellaire concentrique dans laquelle les bicouches de tensioactifs sont séparées par une distance bien précise ;
- La capacité à encapsuler des molécules hydrophiles et hydrophobes.

Les inconvénients de ces structures sont notamment leur instabilité thermodynamique en dispersion et leur incompatibilité avec certains tensioactifs.

## 2.3.5.2.3. Actifs encapsulés dans les oignons

De nombreux actifs ont déjà été encapsulés dans ces structures multilamellaires. Le Tableau 12 en présente quelques exemples.

Tableau 12 : exemples d'actifs encapsulés dans les onions

|                                  | Principes actifs   | Rendements d'encapsulation | Références |
|----------------------------------|--|----------------------------|------------|
| Enzymes                          | <i>Trametes versicolor</i> laccase                           | 54-65 %                    | [176]      |
|                                  | Glucose oxydase  | Environ 80 %               | [177,178]  |
|                                  | Phosphatase alcaline   | 75-90 %                    | [113]      |
| Nanoparticules                   | Oxyde de fer   | Jusque 75 %                | [179]      |
|                                  | $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>                     | 75 ± 5 %                   | [180]      |
|                                  | Cu <sup>2+</sup> (Cu <sub>2</sub> O)                         | 80 %                       | [174]      |
|                                  | Nitrate d'indium et chlorure d'étain                         | -                          | [181]      |
|                                  | KAuCl <sub>4</sub>   | -                          | [182]      |
| Principes actifs pharmaceutiques | Sumatriptan succinate (antimigraigneux)                      | Environ 90 %               | [183]      |
|                                  | Oligonucléotides   | Jusque 80 %                | [184]      |
|                                  | Ligands Arg-Gly-Asp  | -                          | [185]      |
|                                  | ADN  | -                          | [186,187]  |
|                                  | Albumine   | 30-61 %                    | [188,189]  |
|                                  | Calcéine   | 13-66 %                    | [188]      |
|                                  | Rouge de méthyle, rouge de chorophénole, ibuprofen           | -                          | [190]      |
|                                  | B-sous unité de la toxine Shiga                              | -                          | [191]      |
|                                  | Antigènes protéiques   | > 50 %                     | [192]      |
| Acides                           | Plusieurs acides, de l'acide acétique à l'acide dodécanoïque | -                          | [193]      |
| Ions                             | Cl <sup>-</sup> , H <sup>+</sup>                             | -                          | [194]      |
| Colorant                         | Amaranth   | 20-85 %                    | [195]      |

### 3. CONCLUSION

Sans être exhaustif, cet aperçu des grandes techniques d'encapsulation résumé dans le Tableau 13 montre que les possibilités sont nombreuses mais que chaque procédé génère des profils de capsules qui lui sont propres. Les propriétés physico chimiques du ou des principes actifs à encapsuler sont déterminantes dans le choix de la technique d'encapsulation à privilégier. Les contraintes d'équipement associées à certains procédés (mécaniques notamment) peuvent aussi influencer les choix. Enfin, l'objectif

de l'encapsulation ainsi que le type de relargage souhaité terminent d'orienter la sélection des procédés adéquats.

**Tableau 13 : récapitulatif des différentes techniques d'encapsulation courantes avec leurs avantages, inconvénients et spécificités.**

| Procédés          | Technique  | Avantages  | Inconvénients   | Rendements d'encapsulation | Nature des actifs encapsulés                | Références        |
|-------------------|--|--|---|----------------------------|---|-------------------|
| <b>Mécaniques</b> | <b>Séchage par atomisation (spray drying)</b>              | Simple, rapide, économique, facilement transposable et sans réactions chimiques                                    | Perte de matériel importante par adhérence aux parois de la chambre de séchage<br>Non applicable aux systèmes de viscosité trop élevée<br>Consommation d'énergie élevée à cause de l'évaporation de l'eau | Jusque 40-50 %             | Hydrophile ou hydrophobe, liquide ou solide | [104,130,196]     |
|                   | <b>Gélification/congélation de gouttes (spray cooling)</b> | Particules denses et non poreuses<br>Absence de solvant<br>Temps de procédés courts                                | Températures de procédés pouvant affecter les actifs<br>Agglomération   | Jusque 40-60 %             | Hydrophile ou hydrophobe, liquide ou solide | [109,135,136]     |
|                   | <b>Enrobage en lit d'air fluidisé</b>                      | Absence de réaction chimique<br>Coûts de procédé et de maintenance faibles   | Granulométrie au niveau industriel élevée<br>Agglomération<br>Epaisseur de membrane souvent faible<br>Consommation d'énergie élevée (évaporation eau)   | Variable                   | Solide                                      | [104,105,107,137] |
|                   | <b>Extrusion</b>   | Contrôle précis de la forme et de la taille des capsules<br>Haut degré de stabilité des capsules en milieu formulé | Taille de particules importante : 200-1000 µm<br>Non applicable aux actifs trop sensibles, notamment sensibles à l'oxydation.   | Jusque 40 %                | Hydrophobe essentiellement                  | [104,105,107,115] |
|                   | <b>RESS</b>  | Absence de solvants organiques et de tensioactifs  | Limité aux polymères de faibles poids moléculaires  | Variable                   | Hydrophobes                                 | [104,130]         |
|                   | <b>ASES</b>  | Absence de solvants organiques et de tensioactifs  | Agglomération des polymères de faible transition vitreuse   | Variable (5-80 %)          | Hydrophobe, solide                          | [104,130,197,198] |
| <b>Chimiques</b>  | <b>Polymérisation interfaciale</b>                         | Contrôle de la porosité et de l'épaisseur de la paroi en fonction des polymères                                    | Interaction de certains actifs dans la réaction de polymérisation<br>Nombreux lavages nécessaires<br>Sous produits interagissant avec les actifs  | Variable (15-100 %)        | Liquide, hydrophile ou hydrophobe           | [127,128,130]     |

| Procédés          | Technique                                | Avantages  | Inconvénients   | Rendements d'encapsulation                                   | Nature des actifs encapsulés                              | Références        |
|-------------------|--|--|---|--|---|-------------------|
| Physico-chimiques | <b>Evaporation/extraction de solvant</b> | Encapsulation de petites molécules<br>Possibilité de contrôle de la cinétique de relargage grâce au PLGA<br>Utilisation de polymères biodégradables et biocompatibles        | Utilisation de solvants organiques toxique<br>Présence de solvants résiduels  | Variable   | Hydrophiles ou hydrophobes, solides ou liquides           | [130,140,141]     |
|                   | <b>Gélation ionotropique</b>             | Mise à l'échelle du laboratoire aisée  | Mise à l'échelle industrielle compliquée<br>Porosité élevée d'où une fuite rapide des actifs  | 10-30 %  | Hydrophiles ou hydrophobes, Solides, visqueux ou liquides | [104,105,130]     |
|                   | <b>Coacervation simple</b>               | Distribution de taille étroite<br>Pour l'ajout de non-solvant : absence de contact entre la phase continue et l'actif  | Agglomération, utilisation de solvant dans certains cas   | Variable (6-99 %)  | Majoritairement hydrophobes                               | [104,105,145,199] |
|                   | <b>Coacervation simple ou complexe</b>   | Distribution de taille étroite<br>Hauts rendements d'encapsulation<br>Conditions douces (absence de solvants organique et température ambiante)                              | Agents réticulant classiques toxiques: glutaraldéhyde ou formaldéhyde<br>Gamme de pH limitée  | Environ 80 %   | Majoritairement hydrophobes, possibilité hydrophiles      | [104,105]         |
|                   | <b>Emulsions doubles/multiples</b>       | Absence de solvants organiques<br>Possibilité d'encapsuler des actifs hydrophiles et hydrophobes en simultané  | Risque de dégradation des actifs sensibles à la chaleur car nécessité de chauffer les phases à émulsionner (dans la plupart des cas)          | Variables  | Hydrophiles ou hydrophobes                                |                   |
|                   | <b>Liposomes</b>                         | Encapsulation simultanée d'actifs hydrophiles et hydrophobes<br>Augmente l'efficacité des principes actifs<br>Utilisation de molécules constituantes de la structure cutanée | Utilisation de solvants organiques<br>Faible rendements d'encapsulation des actifs hydrophiles<br>Incompatibilité avec certains tensioactifs. | Hydrophiles : 5-15 % pour les SUV, jusqu'à 60 % pour les MLV | Hydrophiles et hydrophobes                                | [200]             |

| Procédés | Technique                                      | Avantages   | Inconvénients   | Rendements d'encapsulation | Nature des actifs encapsulés | Références |
|----------|--|---|---|----------------------------|------------------------------|------------|
|          | <b>Vésicules multilamellaires type oignons</b> | Encapsulation simultanée d'actifs hydrophiles et hydrophobes<br>Augmente l'efficacité des principes actifs<br>Utilisation de molécules constituanes de la structure cutanée<br>Hauts rendements d'encapsulation | Instabilité thermodynamique en phase aqueuse<br>Incompatibilité avec certains tensioactifs. | Variables                  | Hydrophiles et hydrophobes   | [223]      |

## CONCLUSION

Quantités d'études ont démontré l'activité antimicrobienne et antifongique de certaines familles de molécules que l'on retrouve en particulier dans les huiles essentielles, soit des molécules volatiles. Néanmoins, leur utilisation en tant que conservateur d'un produit cosmétique peut se montrer problématique. En effet, leur odeur marquée est parfois rédhibitoire pour une utilisation cosmétique, et la présence d'allergènes, sources de réactions cutanées, voire d'allergies de contact, souvent limitante. Aussi nous a-t-il semblé judicieux de concentrer nos travaux de recherche sur le potentiel antimicrobien d'extraits végétaux dont les familles de molécules non volatiles responsables de l'activité antimicrobiennes auront été établies au préalable et de travailler à la formulation de ces extraits en tant que conservateur cosmétique. En effet, peu d'étude portant sur l'activité antimicrobienne d'extrait végétal sont suffisamment complètes pour proposer un produit fini conservateur efficace.

Les faits montrent également que les conservateurs référencés cosmo-standard présentent bien souvent une activité moins importante que leurs référents synthétiques tels que les parabènes par exemple. Enfin, les extraits conservateurs, mélanges de nombreuses molécules doivent être incorporés en concentration importante pour espérer atteindre une efficacité comparable aux molécules pures. Afin de palier à cet inconvénient prévisible, plusieurs voies ont été étudiées et combinées. Dans un premier temps, la recherche bibliographique a montré que de nombreux facteurs de formulation peuvent impacter le potentiel microbiostatique, voire microbicide du produit fini, mais sans donner de solution claire au formulateur pour orienter le développement de son produit, ni donner d'indication sur les paramètres les plus impactant suivant la nature du produit. Après étude de ces différents paramètres, nous en avons choisi trois qui nous ont paru d'intérêt majeur pour nos travaux.

Il apparaît également nécessaire d'évaluer la solubilité des extraits végétaux aux propriétés antimicrobiennes dans l'objectif de les formuler dans des matrices cosmétiques.

La date limite d'utilisation après ouverture des cosmétiques naturels ou biologiques est bien souvent inférieure à celle des produits classiques contenant des parabènes par exemple. Cela démontre que les conservateurs autorisés par COSMOS-standard ou que les extraits naturels ou matières premières aux propriétés antimicrobiennes utilisés ont une efficacité réduite et très limitée. Afin de potentialiser l'effet antimicrobien d'un extrait végétal aux propriétés antimicrobiennes, il apparaît alors d'intérêt de développer un système de vectorisation afin de retarder partiellement la libération des molécules antimicrobiennes et de conserver ainsi leur biodisponibilité sur une durée prolongée et optimisée.





## CHAPITRE II

### RESULTATS ET DISCUSSION

#### FORMULATION COSMETIQUE



## INTRODUCTION

Dans le cadre de notre étude, 5 formules cosmétiques ont été sélectionnées pour réaliser les essais. Le choix s'est porté vers des formulations variées : une lotion, un gel aqueux, des laits et une crème. Elles présentent la particularité d'être difficiles à conserver. En effet, elles comportent un fort pourcentage en eau (supérieur à 84 % sauf pour la crème qui en comporte 59 %). De plus, elles ne contiennent pas ou peu de matières premières susceptibles de lutter contre ou limiter la croissance microbienne en dehors des conservateurs ajoutés.

Une première partie de l'étude a donc consisté en l'optimisation de ces formules témoins quant à leur capacité à limiter la croissance microbienne par diminution de l'activité de l'eau  $a_w$ . La deuxième partie est consacrée à l'étude de la substitution des conservateurs de synthèse par des extraits végétaux sélectionnés pour leur potentiel antimicrobien d'intérêt dans des formules témoins et des formules optimisées suivant le facteur  $a_w$ .

## PARTIE I : OPTIMISATION DE FORMULATIONS PAR DIMINUTION DE L'ACTIVITE DE L'EAU

L'objectif de cette première étude a été d'optimiser les formulations témoins choisies en diminuant leur activité de l'eau. Au regard des éléments bibliographiques, nous avons choisi de suivre l'impact de la concentration en glycérine et de certains glycols sur cette valeur, puis avons évalué l'influence du protocole de formulation. Par la suite, nous avons élargi l'étude au rôle que peuvent jouer certains agents rhéologiques et ajusteurs de pH sur l' $a_w$ .

### 1. FORMULES TEMOINS

Les cinq formules choisies sont des classiques de la cosmétique et présentent des caractéristiques de formulation variées. Les différences sont notamment les températures de préparation (à froid ou à chaud), la présence ou l'absence d'agent rhéologique, ou encore la présence ou l'absence d'une phase grasse plus ou moins complexe. Les propriétés physico-chimiques sont alors bien différentes d'un produit à l'autre.

Les 5 formulations témoins sont :

- Une lotion tonique (Tableau 14) ;
- Un lait émulsionné à froid (Tableau 15) ;
- Un lait émulsionné à chaud (Tableau 16) ;
- Un gel (Tableau 17) ;
- Une crème hydratante (Tableau 18).

**Tableau 14 : protocole de formulation de la lotion tonique témoin**

|          | Matières premières (INCI)  | %     | Protocole opératoire                                       |
|----------|--|-------|--|
| <b>A</b> | Aqua   | 91,51 | Incorporer B dans A sous agitation                         |
|          | Butylene glycol  | 4,00  |  |
|          | Panthenol, propylene Glycol  | 0,05  |  |
|          | Aqua, propylene glycol, <i>chamomilla recutita</i> extract               | 1,00  |  |
|          | <i>Arnica montana</i> extract, propylene glycol                          | 0,50  |  |
| <b>B</b> | Methylparaben, ethylparaben, propylparaben, butylparaben, phenoxyethanol | 0,60  |  |
|          | Imidazolidinyl urea  | 0,25  |  |
| <b>C</b> | Aqua, <i>rosa damascena</i> extract                                      | 2,00  | Ajouter C  |
| <b>D</b> | CI 16035 (solution à 0,2%)   | 0,03  | Ajuster la coloration en versant D                         |
| <b>E</b> | Parfum   | 0,03  | Ajouter E après avoir mélangé le parfum et le solubilisant |
|          | PPG-1-PEG-9 lauryl glycol ether  | 0,60  |  |

**Tableau 15 : protocole de formulation du lait émulsionné à froid témoin**

|          | Matières premières (INCI)  | %     | Protocole opératoire                  |
|----------|--|-------|---------------------------------------|
| <b>A</b> | Aqua   | 87,90 | Ajouter B dans A sous agitation       |
|          | Glycerin   | 2,00  |                                       |
| <b>B</b> | Paraffinum liquidum  | 8,00  |                                       |
| <b>C</b> | Sodium acrylates copolymer, paraffinum liquidum, PPG-1 trideceth-6       | 1,25  | Ajouter C en fin filet sous agitation |
| <b>D</b> | Methylparaben, ethylparaben, propylparaben, butylparaben, phenoxyethanol | 0,60  | Conserver avec D                      |
|          | Imidazolidinyl urea  | 0,25  |                                       |

**Tableau 16 : protocole de formulation du lait émulsionné à chaud témoin**

|          | Matières premières (INCI) | %     | Protocole opératoire   |
|----------|---------------------------|-------|--|
| <b>A</b> | Aqua                      | 83,75 | Chauffer A à 75 °C   |
|          | Glycerin                  | 2,00  |  |
|          | Disodium EDTA             | 0,10  |  |
| <b>B</b> | Cetyl palmitate           | 1,45  | Chauffer B à 75 °C puis émulsionner en incorporant B dans A sous agitation |
|          | Glyceryl stearate         | 3,45  |  |
|          | Ceteareth-12              | 1,50  |  |
|          | Ceteareth-20              | 1,50  |  |
|          | Cetyl alcohol             | 2,45  |  |
|          | Paraffinum liquidum       | 2,00  |  |

|          | Matières premières (INCI)  | %    | Protocole opératoire  |
|----------|--|------|---|
| <b>C</b> | Methylparaben, ethylparaben, propylparaben, butylparaben, phenoxyethanol | 0,60 | A 30 °C, incorporer C   |
|          | Imidazolidinyl urea  | 0,25 |   |
| <b>D</b> | Biosaccharide gum-1  | 0,20 | Incorporer D sous agitation                                       |
| <b>E</b> | Polyacrylamide, C13-14 isoparaffin, laureth-7                            | 0,75 | Ajuster la viscosité en incorporant en fin filet E sous agitation |

Tableau 17 : protocole de formulation du gel témoin

|          | Matières premières (INCI)  | %     | Protocole opératoire               |
|----------|--|-------|------------------------------------|
| <b>A</b> | Aqua   | 93,84 | Chauffer A à 55 °C                 |
|          | Glycerin   | 4,00  |                                    |
| <b>B</b> | Carbomer   | 0,53  | Disperser B dans A sous agitation  |
| <b>C</b> | Triethanolamine  | 0,60  | Ajouter C                          |
| <b>D</b> | Methylparaben, ethylparaben, propylparaben, butylparaben, phenoxyethanol | 0,60  | Conserver avec D                   |
|          | Imidazolidinyl urea  | 0,25  |                                    |
| <b>E</b> | Triethanolamine  | 0,18  | Ajuster si nécessaire le pH avec E |

Tableau 18 : protocole de formulation de la crème hydratante témoin

|          | Matières premières (INCI)                     | %     | Protocole opératoire  |
|----------|---|-------|---|
| <b>A</b> | Aqua  | 58,92 | Chauffer A à 55 °C  |
|          | Glycerin                                      | 4,00  |   |
| <b>B</b> | Acrylates/C10-30 alkyl acrylate crosspolymer  | 0,15  | Saupoudrer B en fine pluie. Bien laisser le gel s'hydrater                  |
| <b>C</b> | Polyoxyethylene (2), stearyl ether            | 2,00  | Chauffer C à 75 °C, chauffer A+ B à 75 °C et émulsionner C dans A+B à 75 °C |
|          | Steareth-21, polyethoxylated alcohol          | 2,00  |   |
|          | Stearyl alcohol                               | 1,50  |   |
|          | Glyceryl stearate                             | 3,00  |   |
|          | Octyldodecanol                                | 3,00  |   |
|          | Squalane                                      | 2,50  |   |
|          | Isohexadecane                                 | 3,00  |   |
|          | <i>Simmondsia chinensis</i> (jojoba) seed oil | 1,50  |   |
|          | <i>Triticum vulgare</i> (weat) germ oil       | 1,50  |   |
|          | Butylhydroxytoluene                           | 0,05  |   |

|          | Matières premières (INCI)  | %    | Protocole opératoire            |
|----------|--|------|---------------------------------|
|          | Butyrospermum parkii butter  | 2,00 |                                 |
|          | Dimethicone  | 1,50 |                                 |
|          | Butyl methoxydibenzoyl-methane   | 1,00 |                                 |
|          | Ethylhexyl methoxycinnamate  | 1,50 |                                 |
|          | Dimethicone  | 2,00 |                                 |
| <b>D</b> | Triethanolamine  | 0,11 | Verser D et E à 60 °C           |
| <b>E</b> | Isononyl isononanoate, titanium dioxide                                  | 1,25 |                                 |
| <b>F</b> | Panthenol, propylene glycol  | 0,20 | Incorporer F, G, H et I à 30 °C |
|          | Tocopheryl   | 0,50 |                                 |
| <b>G</b> | Sodium hyaluronate   | 5,85 |                                 |
| <b>H</b> | Parfum   | 0,10 |                                 |
| <b>I</b> | Methylparaben, ethylparaben, propylparaben, butylparaben, phenoxyethanol | 0,60 |                                 |
|          | Imidazolidinyl urea  | 0,25 |                                 |

Pour la réalisation de ces essais, toutes les formulations ont été conservées avec 0,6 % de Phenochem (mélange de 4 parabènes et de phénoxyéthanol) ainsi que 0,25 % de Sepicide CI (imidazolidinyl urée).

Pour chacune de ces formules ont été mesurées les valeurs d' $a_w$  définies comme valeurs témoins. Ces valeurs sont exposées dans le Tableau 19. A J+1, nous notons que les laits et le gel ont une  $a_w$  supérieure à 0,97 à une température d'environ 26 °C (l'appareillage utilisé ne permet pas de fixer la température de mesure). D'après les données bibliographiques, les 5 microorganismes (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *A. niger* et *C. albicans*) contre lesquels les produits cosmétiques doivent être protégés peuvent tous se développer pour une  $a_w$  supérieure à 0,97 à 25 °C (Tableau 4) [46]. Ces premières mesures paraissent donc confirmer que ces produits sont propices aux développements microbiens. La lotion et la crème présentent une  $a_w$  très légèrement inférieure à 0,97 à 26 °C. Or l' $a_w$  minimale de croissance de *P. aeruginosa* à 25 °C est de 0,97. Ces produits devraient donc être moins sujets aux développements de cette bactérie.

Nous notons ensuite qu'à 6 semaines, les valeurs mesurées sur les produits conservés à température ambiante (20-25 °C) varient légèrement. Une diminution systématique de l'activité de l'eau est observée. Nous pouvons penser à une légère évaporation de l'eau des produits pouvant expliquer cette baisse. De plus, nous constatons que les températures de mesures sont plus basses, de l'ordre de 23-24 °C. Or l'activité de l'eau dépend de la température car la pression de vapeur d'eau d'une solution dépend de la température [201]. Il nous semble donc raisonnable de conclure qu'à 25 °C, la lotion et la crème présentent effectivement une  $a_w$  inférieure à 0,97, limitant ainsi la croissance de *P. aeruginosa*, mais pas des 4 autres microorganismes. Les mesures ne permettent pas

de conclure sur le comportement des autres formulations vis à vis de cette bactérie Gram (-).

**Tableau 19 : valeurs d' $a_w$  des formulations témoins à J+1 ainsi qu'à S+6, à Tamb**

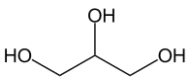
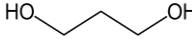
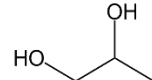
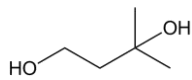
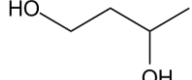
| Formules     | Mesures à J+1 |            |        | Mesures à S+6 (6 semaines) |            |        |
|--------------|---------------|------------|--------|----------------------------|------------|--------|
|              | $a_w$         | Ecart type | T (°C) | $a_w$                      | Ecart type | T (°C) |
| Lotion       | <b>0,970</b>  | 0,001      | 26,0   | <b>0,955</b>               | 0,001      | 24,1   |
| Lait à Froid | <b>0,973</b>  | 0,001      | 26,5   | <b>0,952</b>               | 0,004      | 23,5   |
| Lait à chaud | <b>0,971</b>  | 0,000      | 26,3   | <b>0,950</b>               | 0,001      | 23,2   |
| Gel          | <b>0,971</b>  | 0,001      | 26,5   | <b>0,953</b>               | 0,000      | 23,8   |
| Crème        | <b>0,961</b>  | 0,001      | 26,2   | <b>0,940</b>               | 0,004      | 24,0   |

A partir de ces mesures et observations, l'objectif a été de définir des solutions pour abaisser l'activité de l'eau pour chacune des formulations afin de lutter contre la croissance d'un maximum de microorganismes.

## 2. IMPACT DE LA GLYCERINE ET DE GLYCOLS SUR L' $A_w$

Les glycols ont la capacité d'abaisser l'activité de l'eau. En effet, ces molécules peuvent former des liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau [202], liant ainsi l'eau présente dans un produit. Nous avons donc choisi de comparer l'impact de la glycérine (glycérol), du propylène glycol (propane-1,2-diol), du Zéméa (propane-1,3-diol), du butylène glycol (butane-1,3-diol) et de l'isopentyldiol (3-méthyl-1,3-butanediol) dont les structures chimiques sont représentées dans le Tableau 20.

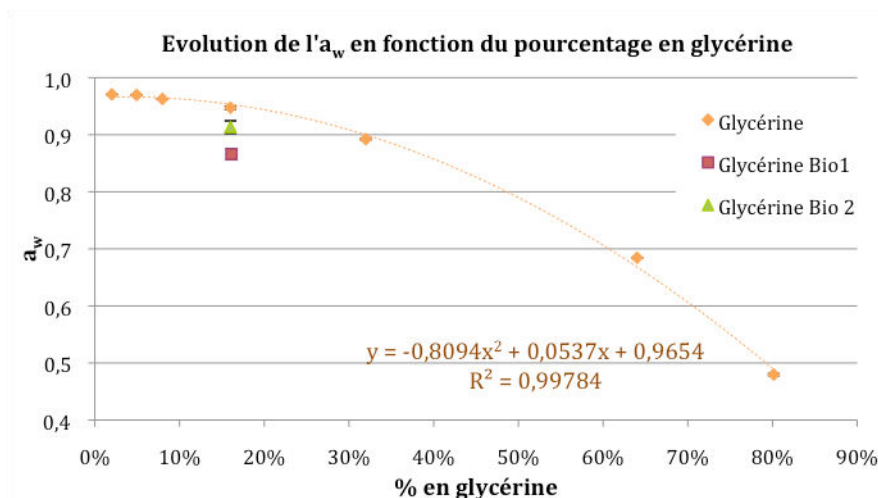
**Tableau 20 : structures de la glycérine et des glycols étudiés**

| Noms       | Glycérine   | Propan-1,3-diol   | Propan-1,2-diol   | Isopentyldiol  | Butylène glycol   |
|------------|---|---|---|--|---|
| Structures |  |  |  |  |  |

Dans un premier temps, nous avons testé l'impact de chacune des matières premières dans l'eau, à différentes concentrations. Le protocole appliqué (nommé protocole 1 dans le Tableau 24) pour cette première étape a été le même que celui des formulations témoins. La glycérine ou le glycol ont été pesés avec l'eau et homogénéisés avant de mesurer l' $a_w$ .

Les résultats obtenus pour la glycérine (Figure 9) montrent qu'à partir de 8 % en glycérine, l'activité de l'eau est inférieure à 0,97, valeur minimale de croissance de *P. aeruginosa*. A 16 % en glycérine, l' $a_w$  est inférieure à 0,95, valeur minimale de croissance de *E. coli*. Enfin, une concentration supérieure à 32 % en glycérine est nécessaire pour réduire le développement des autres microorganismes, concentration rédhibitoire pour

la formulation de produits cosmétiques en général à cause des répercussions sensorielles, telle que l'obtention de produits collants.



**Figure 9 :** Evolution de l'activité de l'eau  $a_w$  en fonction du pourcentage massique en glycérine et comparaison avec 2 glycérines biologiques à 16 %. Les barres d'erreurs sont incluses dans les symboles.

Nous avons ensuite comparé la valeur obtenue à 16 % en glycérine avec deux glycérines biologiques commerciales préparées dans les mêmes conditions. D'importantes différences ont été notées. En effet, alors que la glycérine témoin présente une  $a_w$  de  $0,947 \pm 0,003$ , l' $a_w$  de la glycérine bio 1 est de  $0,913 \pm 0,011$  et celle de la glycérine bio 2 de  $0,866 \pm 0,010$ . Cette dernière valeur est des plus intéressantes car inférieure à la valeur minimale de croissance de *C. albicans* (0,87). Ces différences pourraient être expliquées par l'origine et la pureté des glycérines. Par exemple, alors que la glycérine témoin est pure à 99,5 % (le reste étant de l'eau [203]), la glycérine bio 2 obtenue par fractionnement d'huiles de maïs et de soja est pure à 98 %. Nous pouvons donc penser que des résidus issus du fractionnement des huiles peuvent être présents dans les 2 % restant, expliquant peut être les différences de résultats observés. Cependant, nous n'avons pas obtenu d'information sur la nature de ces composés résiduels.

Les résultats obtenus pour les propane-diols (Figure 10) sont similaires aux concentrations extrêmes ( $\leq 5$  % et  $\geq 65$  %). Entre 5 et 65 %, le propane-1,2-diol s'avère plus intéressant, car les  $a_w$  mesurées sont inférieures à celle obtenues pour le propane-1,3-diol. Nous pouvons en déduire que la position des groupements hydroxyles sur la chaîne carbonée joue un rôle important pour lier les molécules d'eau et que le propane-1,2-diol est mieux stabilisé dans l'eau que le propane-1,3-diol.

Afin de confirmer cette observation, nous avons modélisé ces molécules et comparé leur énergie de solvation  $E_{solv}$  dans l'eau. Pour ce faire, nous avons optimisé la géométrie des molécules en minimisant les forces sur les atomes suivant leur environnement. En effet, le milieu dans lequel se trouve la molécule (solubilisée ou dispersée) influence sa polarisabilité et donc sa géométrie.



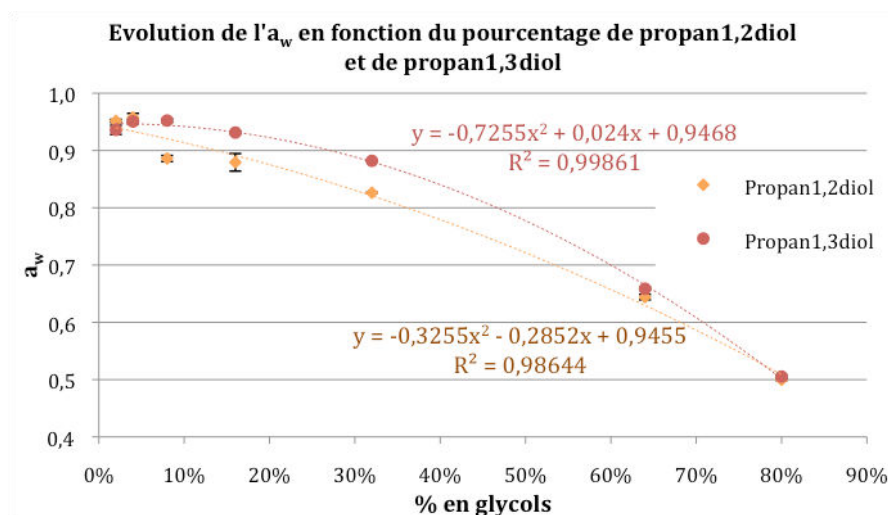


Figure 10 : évolution de l'activité de l'eau  $a_w$  en fonction du pourcentage massique en propane-1,2-diol et propane-1,3-diol

Dans une première étape, nous avons donc modélisé les géométries des propan-1,2-diol (P12D) et propan-1,3-diol (P13D) dans un solvant (l'eau) (Figure 11). Nous avons ensuite calculé la différence d'énergie entre les deux molécules dans ce solvant, la molécule la plus stable ayant l'énergie la plus basse. Cette comparaison est possible car les deux molécules ont le même nombre d'atomes. Les résultats sont exposés dans le Tableau 21. La différence d'énergie calculée, -0,00400780 Ha équivaut à -2,51493301 kcal/mol. Dans la classification des liaisons hydrogènes, cette valeur correspond des interactions électrostatiques faibles (0-4 kcal/mol) [204]. Dans notre étude, nous pouvons estimer que ce résultat est suffisant pour conclure que le propan-1,2-diol est mieux stabilisé dans l'eau que le propan-1,3-diol, confirmant ainsi nos mesures d' $a_w$ .

Tableau 21 : énergies et différence d'énergie des propane-diols dans l'eau, exprimées en Hartree (Ha) puis en Kcal/mol

|                 | $E_{\text{(eau)}} \text{ (Ha)}$ | $E_{\text{P12D}} - E_{\text{P13D}} \text{ (Ha)}$ | $E_{\text{P12D}} - E_{\text{P13D}} \text{ (Kcal/mol)}$ |
|-----------------|---------------------------------|--|--|
| Propan-1,2-diol | -269,61592327                   | -0,00400780                                      | -2,51493301  |
| Propan-1,3-diol | -269,61191547                   |  |  |

Dans une deuxième étape, nous avons calculé l'énergie de solvation des deux diols en modélisant les géométries des propan-1,2-diol (P12D) et propan-1,3-diol (P13D) dans le vide. La différence d'énergie des molécules dans chaque milieu donne l'énergie de solvation  $E_{\text{solv}}$  des molécules selon l'équation :

$$E_{\text{solv}} = E_{m1(\text{solvant})} - E_{m1(\text{vide})}$$

Où  $E_{m1(\text{solvant})}$  correspond à l'énergie de la molécule 1 dans l'eau et  $E_{m1(\text{vide})}$  l'énergie de la molécule 1 dans le vide.

Plus l'énergie de solvation est faible, plus la molécule est stabilisée par le solvant. Le Tableau 22 expose les énergies des propane-diols dans l'eau et dans le vide ainsi que leurs énergies de solvation.

**Tableau 22 : énergies des propane-diols de géométries optimisées dans l'eau et le vide, exprimées en Hartree (Ha) puis en Kcal/mol**

|                 | $E_{\text{(eau)}} \text{ (Ha)}$ | $E_{\text{(vide)}} \text{ (Ha)}$ | $E_{\text{solv}} \text{ (Ha)}$ | $E_{\text{solv}} \text{ (Kcal/mol)}$ |
|-----------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| Propan-1,2-diol | -269,61592327                   | -269,59953129                    | -0,01639198                    | -10,28612494                         |
| Propan-1,3-diol | -269,61191547                   | -269,59098870                    | -0,02092677                    | -13,13174924                         |

Nous pouvons alors calculer  $\Delta E_{\text{solv}}$  comme suit :

$$\Delta E_{\text{solv}} = E_{\text{solv(P12D)}} - E_{\text{solv(P13D)}} = 0,00453479 \text{ Ha} = 2,8456243 \text{ Kcal/mol}$$

Cette valeur positive semble indiquer que le propan-1,3-diol serait mieux stabilisé dans l'eau que le propan-1,2-diol, ce qui est contraire aux résultats précédents.

Néanmoins, nous avons remarqué, lors de l'optimisation, que la géométrie du propan-1,2-diol dans le vide était différente de celle obtenue dans l'eau, alors que le propan-1,3-diol conserve la même géométrie quelque soit le milieu (Figure 11). En effet, dans le gaz, nous observons la création d'une liaison hydrogène entre l'hydrogène de l'hydroxyle en position C1 et l'oxygène de l'hydroxyle en position C2, liaison qui n'existe pas lorsque la molécule est dans l'eau. La création de cette liaison tend alors à stabiliser la molécule dans le vide, abaissant par ailleurs son énergie dans ce milieu. Nous avons alors recalculé l'énergie de la molécule dans le vide en conservant la géométrie obtenue dans l'eau afin de comparer réellement son comportement par rapport au propan-1,3-diol. Bien que la géométrie de ce dernier ne change pas du vide à l'eau, nous avons recalculé l'énergie de la molécule dans le vide en conservant les paramètres d'optimisation dans l'eau, ceci afin de comparer rigoureusement les deux molécules dans des conditions similaires. Les calculs obtenus ainsi sont exposés dans le Tableau 23.

**Tableau 23 : énergies du propan-1,2-diol dans l'eau et le vide en conservant la géométrie optimisée dans l'eau, exprimées en Hartree (Ha) puis en Kcal/mol**

|                 | $E_{\text{(eau)}} \text{ (Ha)}$ | $E_{\text{(vide)}} \text{ (Ha)}$ | $E_{\text{solv}} \text{ (Ha)}$ | $E_{\text{solv}} \text{ (Kcal/mol)}$ |
|-----------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| Propan-1,2-diol | -269,61592327                   | -269,5923041                     | -0,02361918                    | -14,82126238                         |
| Propan-1,3-diol | -269,61191547                   | -269,5903711                     | -0,02154438                    | -13,51930545                         |

Nous notons alors que l'énergie de solvation du propan-1,2-diol est bien plus basse que la précédente. Nous remarquons également que, bien que la géométrie du propan-1,3-diol ne varie pas de l'eau au vide, l'énergie de la molécule optimisée dans le vide,

avec les contraintes définies dans l'eau ou non, varie. Nous pouvons alors recalculer  $\Delta E_{solv}$  :

$$\Delta E_{solv} = E_{solv(P12D)} - E_{solv(P13D)} = -0,001933 \text{ Ha} = -1,30195693 \text{ Kcal/mol}$$

Ce nouveau résultat confirme cette fois la plus grande stabilité du propan-1,2-diol dans l'eau que le propan-1,3-diol. Ce résultat vient appuyer les premiers calculs ainsi que les mesures d' $a_w$  effectuées.

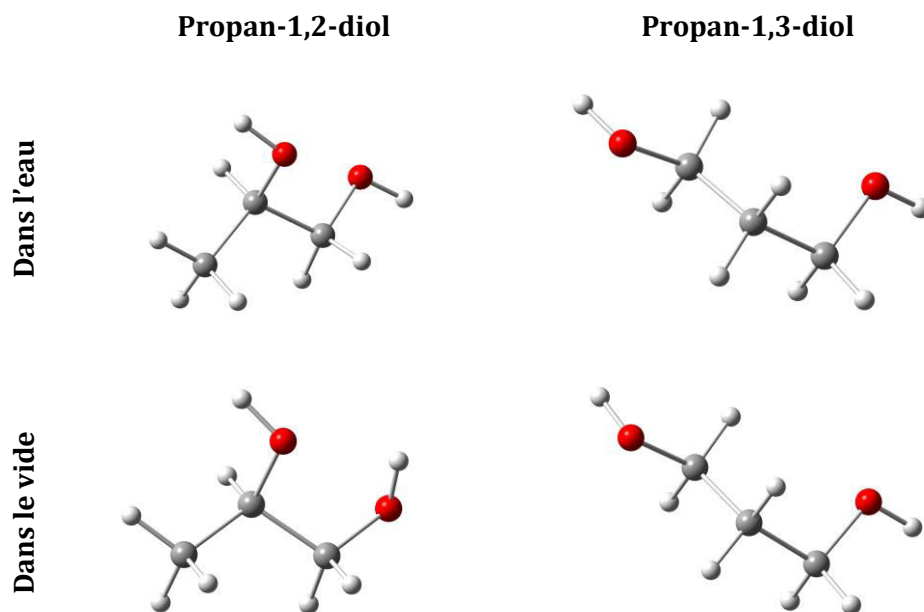


Figure 11 : optimisation géométrique des (à gauche) propan-1,2-diol et (à droite) propan-1,3-diol dans (en haut) l'eau et (en bas) dans le vide.

Les mesures d' $a_w$  ayant été effectuées à une température de 23 °C, nous pouvons considérer que le propane-1,3-diol permet de limiter la croissance de *P. aeruginosa* et *E. coli* à partir de 16 % et au delà de 32 % pour les autres microorganismes, alors que le propane-1,2-diol s'avère d'intérêt dès 8 % avec une  $a_w$  de  $0,882 \pm 0,005$ .

Par comparaison avec la glycérine témoin, nous observons que les deux propane-diols donnent de meilleurs résultats à 16 %, alors qu'à 80 %, c'est la glycérine qui donne la valeur d' $a_w$  la plus basse.

Les mesures effectuées (à 23 °C) à partir du butylène glycol et de l'isopentyldiol (Figure 12) indiquent que ce dernier se montre plus efficace pour abaisser l' $a_w$ , sauf à la concentration la plus élevée testée, à savoir 80 %. Il est possible que la présence des groupements méthyles influence la stabilité des interactions avec les molécules d'eau (effet iceberg) [205]. Nous remarquons qu'aux concentrations supérieures à 64 %, ces deux glycols se montrent systématiquement moins intéressants que la glycérine et les propanediols. Par contre, l'isopentyldiol se montre particulièrement efficace à 8 et 16 % avec des valeurs d' $a_w$  de  $0,867 \pm 0,028$  et  $0,847 \pm 0,010$  respectivement. A 16 %,

l'isopentyldiol serait donc efficace pour lutter contre la croissance de tous les microorganismes à l'exception d'*A. niger* (Tableau 4).

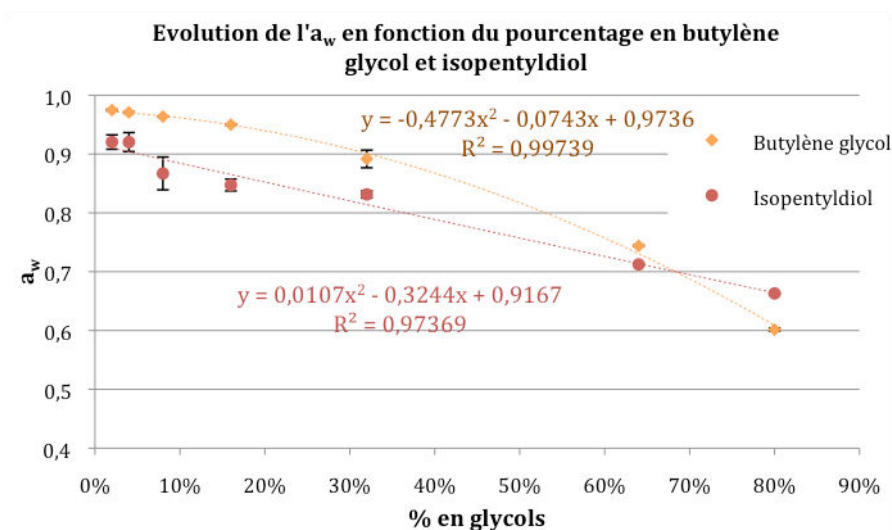


Figure 12 : évolution de l'activité de l'eau  $a_w$  en fonction du pourcentage en butylène glycol et en isopentyldiol

Ainsi, nous observons que pour obtenir une activité de l'eau suffisamment basse pour ralentir la croissance des cinq microorganismes d'intérêt, les concentrations en glycérine ou en glycol à incorporer sont trop importantes pour des formulations cosmétiques classiques. Nous avons noté des différences entre des matières premières présentant une même structure chimique mais d'origine et de pureté différentes (glycérine). Des différences sont notables entre deux molécules de même formule brute, mais de formules développées différentes (propane-diols), et enfin la présence du méthyl supplémentaire en position C3 du 3-méthyl-1,3-butanediol améliore le potentiel de la molécule à abaisser l' $a_w$  par comparaison avec le butane-1,3-diol, sauf à très haute concentration.

À 80 %, concentration la plus élevée testée, c'est la glycérine qui présente le plus fort potentiel pour abaisser l' $a_w$ . À 8 et 16 %, c'est l'isopentyldiol qui est le plus prometteur.

## 2.1 Influence du protocole de formulation

L'étape suivante a consisté à évaluer l'impact du protocole de formulation sur l' $a_w$ . Les essais ont tout d'abord été réalisés à partir de la glycérine témoin à 16 % dans l'eau. Le Tableau 24 présente les cinq protocoles testés.

La Figure 13 présente les valeurs d' $a_w$  de la solution à 16 % en glycérine en fonction des protocoles testés. Les résultats montrent des différences significatives, notamment entre le protocole 1 (protocole témoin) et les protocoles 4 et 5. En comparaison avec le protocole témoin, les valeurs d' $a_w$  sont abaissées de 7,5 % et 6,5 % avec les protocoles 4 et 5 respectivement. Ces deux protocoles d'intérêts sont ceux pour lesquels la glycérine est incorporée doucement dans l'eau sous agitation. Nous pouvons en déduire que cette méthode de formulation permet aux molécules de glycérol de se lier à l'eau au fur et à

mesure de leur incorporation de manière plus efficace qu'avec les autres protocoles. Le protocole 4 est donc sélectionné comme protocole optimisé, avec une  $a_w$  de  $0,876 \pm 0,090$  à 24 °C pour la solution testée.

**Tableau 24 : description des 5 protocoles appliqués à une solution contenant 16 % de glycérine dans l'eau avant mesure des  $a_w$**

| Protocoles appliqués à une solution contenant 16 % de glycérine |  |
|---|--|
| Protocole 1   | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Peser l'eau et la glycérine</li> <li>▪ Homogénéiser sous agitation magnétique</li> </ul>  |
| Protocole 2   | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Peser la glycérine</li> <li>▪ Mettre sous agitation à l'aide d'une hélice défloculeuse</li> <li>▪ Ajouter l'eau goutte à goutte</li> </ul>  |
| Protocole 3   | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Peser l'eau et la glycérine</li> <li>▪ Homogénéiser à l'aide d'une hélice défloculeuse</li> <li>▪ Monter la température à 75 °C au bain-marie</li> <li>▪ Agiter à l'hélice défloculeuse pendant 10 min</li> </ul> |
| Protocole 4   | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Peser l'eau</li> <li>▪ Mettre sous agitation à l'aide d'une hélice défloculeuse</li> <li>▪ Ajouter la glycérine goutte à goutte</li> <li>▪ Poursuivre l'agitation pendant 5 min</li> </ul>                        |
| Protocole 5   | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Peser l'eau</li> <li>▪ Mettre sous agitation à l'aide d'une hélice défloculeuse</li> <li>▪ Ajouter la glycérine goutte à goutte</li> <li>▪ Poursuivre l'agitation pendant 15 min</li> </ul>                       |

Ce protocole optimisé est ensuite appliqué à d'autres matières premières, à une concentration de 4 % pour vérifier la généralisation des résultats observés. La concentration de 4 % est sélectionnée car elle correspond au pourcentage en glycérine ou butylène glycol dans la crème, le gel et la lotion témoin. Etant donné que les formules témoins contiennent soit de la glycérine, soit du butylène glycol, nous avons appliqué ce nouveau protocole à la glycérine témoin et son référent biologique 2 ainsi qu'au butylène glycol et un référent biologique. En effet, à ce stade de l'étude, il nous a semblé intéressant, lorsque cela était possible, d'introduire des matières premières d'origines différentes (biologiques notamment) à la vue des résultats précédemment obtenus avec les glycéries.

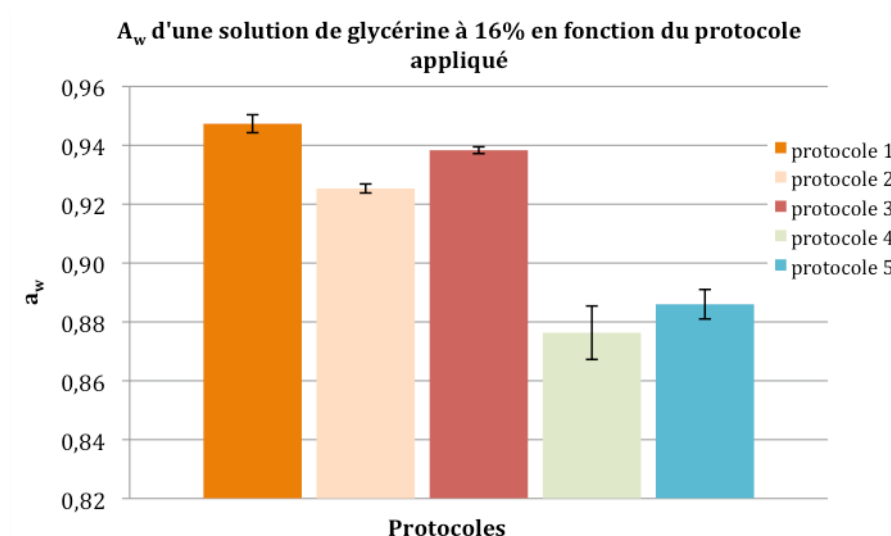


Figure 13 : activité de l'eau d'une solution de glycérine à 16 % dans l'eau en fonction du protocole de formulation

Les résultats présentés Figure 14 confirment que le protocole 4 réduit systématiquement l' $a_w$ .

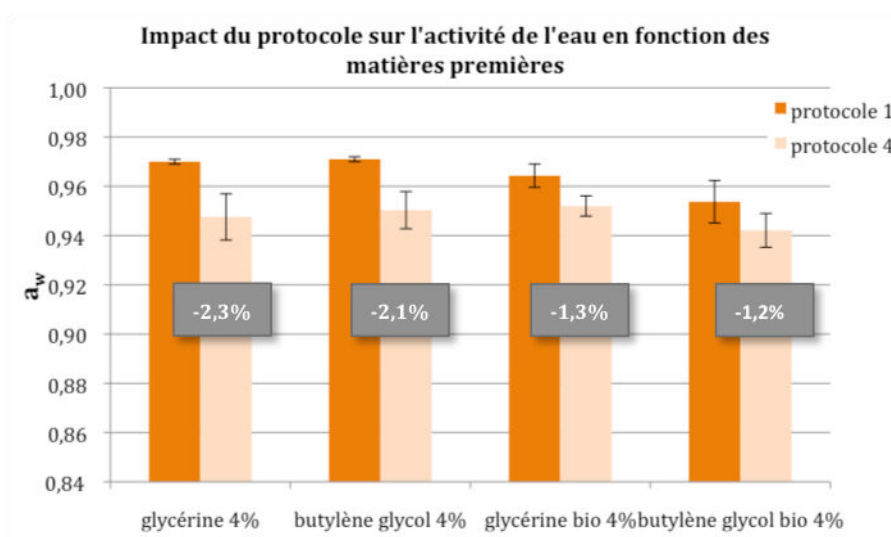
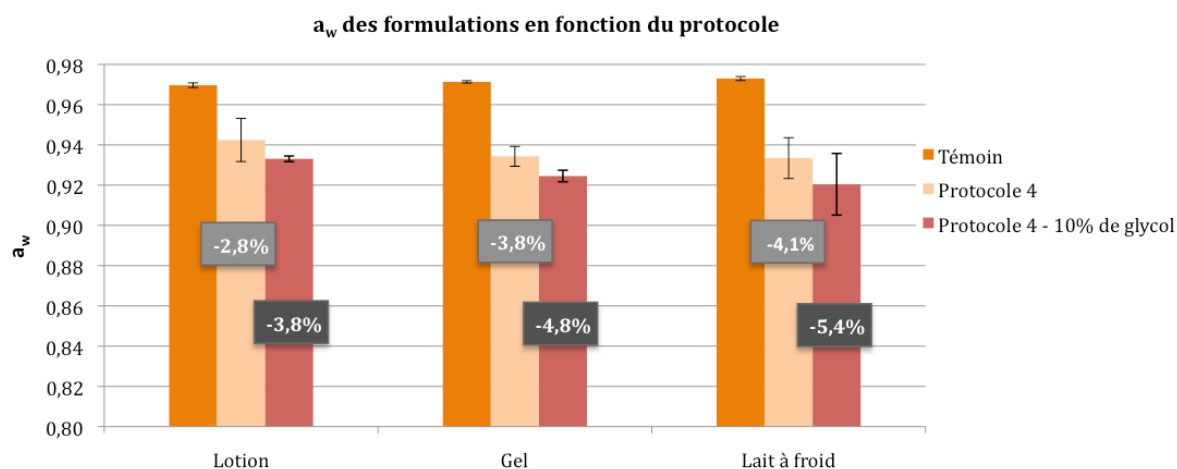


Figure 14 : application du protocole 4 en comparaison avec le protocole 1 témoin à d'autres matières premières, à 4 %, à 24°C

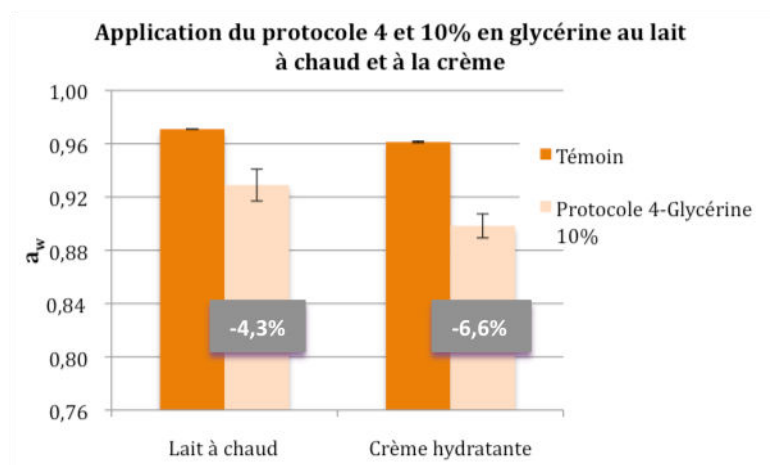
## 2.2 Application aux formules

Le protocole 4 a été appliqué aux formulations de la lotion tonique, du gel et du lait émulsionné à froid, sans modification de la composition des formules (Figure 15). Ce nouveau protocole permet effectivement d'abaisser l' $a_w$  des trois formulations concernées. Les nouvelles valeurs obtenues (à 24 °C) offrent aux formulations une meilleure protection contre les développements de *P. aeruginosa* et *E. coli*. Par la suite, les formulations ont été préparées avec ce nouveau protocole en augmentant la concentration en glycérine (lait à froid et gel) ou butylène glycol (lotion tonique) de 4 % à 10 % (Figure 15). Une diminution de l' $a_w$  est de nouveau observée par rapport aux

formules à 4 %, améliorant ainsi la protection contre *P. aeruginosa* et *E. coli*. Mais les valeurs obtenues ne permettent pas de limiter la croissance des autres microorganismes d'intérêt.

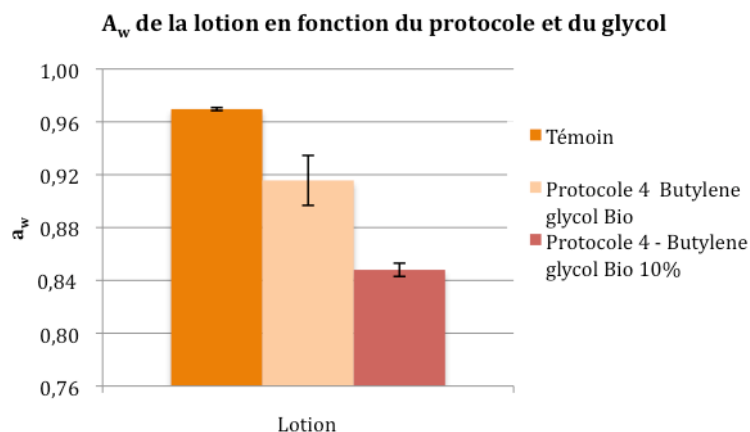


**Figure 15 : impact du protocole 4 par rapport au protocole 1 témoin sur l' $a_w$  de la lotion, du gel et du lait émulsionné à froid puis impact du protocole 4 avec modification de la concentration en glycérine ou butylène glycol à 10 % au lieu de 4 %**



**Figure 16 : application du protocole 4 et de la modification de la concentration en glycérine (de 4 à 10 %) au lait émulsionné à chaud ainsi qu'à la crème hydratante. Comparaison des  $a_w$  obtenues avec les formulations témoins.**

Le protocole 4 avec 10 % de la matière première étudiée a ensuite été appliqué à la crème hydratante ainsi qu'au lait émulsionné à chaud (Figure 16). Une importante diminution de l' $a_w$  a également été mesurée, avec 4,3 % de réduction sur le lait à chaud et 6,6 % pour la crème en comparaison des témoins. Pour la première fois, nous avons obtenu une formulation présentant une  $a_w$  inférieure à 0,90. La crème contenant 10 % de glycérine, formulée avec le protocole 4 donne en effet une  $a_w$  de  $0,898 \pm 0,009$  à 25°C. Cette valeur permet d'envisager un ralentissement encore plus marqué de la croissance de *P. aeruginosa* et *E. coli*. Cependant, cette valeur n'offre toujours pas de protection contre *S. aureus*, ni contre les levures et moisissures considérées.



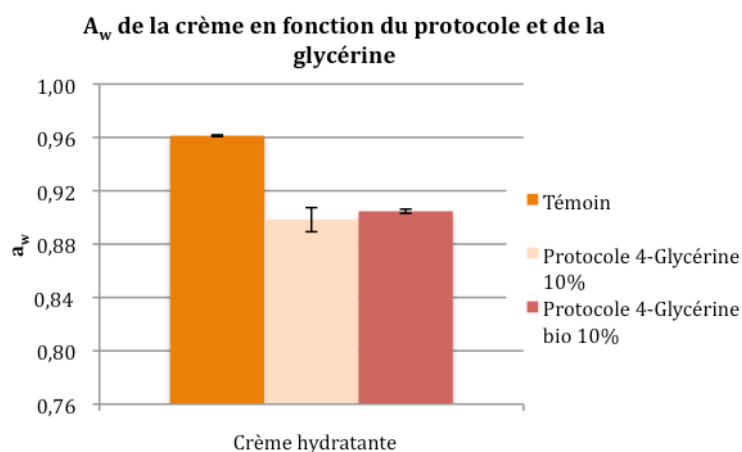
**Figure 17 : remplacement du butylène glycol classique avec le butylène glycol biologique. Comparaison des  $a_w$  du témoin avec la lotion contenant 4% puis 10 % du produit biologique.**

Ayant démontré que certaines matières premières biologiques abaissaient plus fortement l' $a_w$  que leurs référents synthétiques, nous avons souhaité en évaluer l'impact sur deux formulations, la lotion tonique (Figure 17) et la crème hydratante (Figure 18). Nous avons comparé le témoin de la lotion avec la formule contenant 4 % de butylène glycol biologique formulé avec le protocole 4. Puis, avec ce même protocole, nous avons préparé la lotion avec 10 % de butylène glycol biologique. Nous remarquons avec intérêt que la valeur d' $a_w$  obtenue avec 4 % de butylène glycol biologique ( $0,916 \pm 0,019$ ) est déjà inférieure à celle obtenue avec 10 % de butylène glycol classique ( $0,933 \pm 0,001$ , Figure 15) dans les mêmes conditions de préparation. De plus, la formule préparée avec 10 % du butylène glycol biologique présente une  $a_w$  de  $0,848 \pm 0,043$ , valeur la plus faible obtenue jusqu'alors. Cette valeur doit permettre de limiter la croissance de *C. albicans* ( $a_w$  minimale de croissance = 0,87 à 25°C) ainsi que *S. aureus* ( $a_w$  minimale de croissance = 0,86 à 25°C). La lotion formulée dans ces conditions offre donc une protection théorique contre 4 des 5 microorganismes étudiés. De plus, aucune modification sensorielle de cette formule optimisée n'a été observée, ce qui rend le nouveau produit d'autant plus intéressant. La crème hydratante a été formulée directement avec 10 % de glycérine biologique. Par comparaison avec la glycérine classique à même concentration, nous ne notons pas de différence notable d' $a_w$  (Figure 18).

Jusqu'à présent, nous avons ainsi démontré que la concentration en glycols influence l'activité de l'eau en fonction de la nature de ce dernier et que l'ordre et la vitesse d'incorporation de ces matières premières dans l'eau influence la valeur finale de l' $a_w$  dans un produit fini.

Des valeurs d'intérêts ont été obtenues pour différentes formulations. Nous avons alors envisagé de tester l'une de ces formules optimisée en challenge test.





**Figure 18 : remplacement de la glycérine classique avec la glycérine biologique. Comparaison des  $a_w$  du témoin avec la crème contenant 10 % de glycérine classique puis 10 % de produit biologique.**

### 3. CHALLENGE TEST

Un challenge test a été effectué sur la crème contenant 10 % de glycérine biologique, formulée suivant le protocole 4. Les résultats ont été comparés avec la formulation de la crème témoin et sont exposés Tableau 25. Si nous comparons les résultats obtenus à 14 jours, nous observons alors que la crème optimisée en  $a_w$  se montre systématiquement meilleure que le témoin. L'activité antibactérienne est notamment très intéressante. Nous notons que pendant 14 jours, les réductions logarithmiques de *P. aeruginosa* et *S. aureus* sont conformes au critère B de la Pharmacopée Européenne. L'activité est un peu moins marquée contre *E. coli* puisque la réduction n'est pas suffisante à 14 jours pour respecter le critère B. Les mesures concernant *C. albicans* et *A. brasiliensis* montrent que les produits ne permettent pas une réduction suffisamment importante des micro-organismes pour être conforme à la réglementation. Néanmoins, les résultats obtenus sont meilleurs que le témoin puisque ce dernier inhibe la croissance de *C. albicans* sans pour autant détruire le microorganisme alors que la formule optimisée permet une réduction de 0,2 log. De plus, nous observons une croissance d'*A. brasiliensis* dans la crème témoin alors qu'une légère inhibition est mesurée dans le produit optimisé. Ainsi, bien que le produit optimisé ne soit pas conforme à la Pharmacopée européenne pour 3 souches à 14 jours, il se montre plus performant que le témoin.

Deux explications peuvent être données pour interpréter ces résultats. En premier lieu, nous pouvons penser que la réduction de l'activité de l'eau joue un rôle, notamment contre *P. aeruginosa* dont l'activité minimale de croissance est de 0,97. De même, nous pourrions interpréter les réductions logarithmiques plus importantes sur les deux autres bactéries (*E. coli* et *S. aureus*) grâce à la réduction de la quantité d'eau libre dans le milieu. Mais il faut également penser à l'impact de la concentration en glycérine dans le milieu qui peut augmenter les propriétés antimicrobiennes. En effet, les concentrations minimales d'inhibition (CMI) de la glycérine sont de 10 % pour *E. coli*, 5 % pour *P. aeruginosa*, 20 % pour *S. aureus* et 30 % pour *C. albicans* et *A. brasiliensis*.

Notre produit contenant 10 % de glycérine, Nous pouvons en conclure que l'impact de cette concentration peut être conséquent.

Malheureusement, ces essais ne nous permettent pas de distinguer l'apport de chaque facteur (concentration en glycérine et réduction de l'eau libre) dans le milieu. Pour ce faire, il aurait été intéressant de tester les formulations en substituant la glycérine par d'autres matières premières abaissant l' $a_w$ , de manière à comparer l'activité antimicrobienne à  $a_w$  équivalente, mais pour différentes compositions. Ici, nous pouvons simplement conclure à une amélioration intéressante du potentiel antimicrobien de la crème, et notamment antibactérien. Les tests sur ces produits ont été interrompus au bout de 14 jours.

**Tableau 25 : résultats des challenges tests de la crème témoin et de la crème contenant 10 % de glycérine bio formulée selon le protocole optimisé. Conformité avec les critères Pharmacopée Européenne (réductions logarithmiques et interprétation). Les résultats marqués en vert montrent une performance significativement améliorée de la crème optimisée par rapport au témoin.**

| Souches          | <i>P. aeruginosa</i> |    |                 |     | <i>S. aureus</i> |     |      |     | <i>E. coli</i> |     |     |     | <i>C. albicans</i> |    |     |     | <i>A. brasiliensis</i> |    |      |     |
|------------------|----------------------|----|-----------------|-----|------------------|-----|------|-----|----------------|-----|-----|-----|--------------------|----|-----|-----|------------------------|----|------|-----|
| Jours            | J2                   | J7 | J14             | J28 | J2               | J7  | J14  | J28 | J2             | J7  | J14 | J28 | J2                 | J7 | J14 | J28 | J2                     | J7 | J14  | J28 |
| <b>Critère A</b> | ≥2                   | ≥3 | -               | NI* | ≥2               | ≥3  | -    | NI  | ≥2             | ≥3  | -   | NI  | /                  | /  | ≥2  | NI  | /                      | /  | ≥2   | NI  |
| <b>Critère B</b> | -                    | -  | ≥3              | NI  | -                | -   | ≥3   | NI  | -              | -   | ≥3  | NI  | /                  | /  | ≥1  | NI  | /                      | /  | ≥1   | NI  |
| Témoin           | 1,3                  | >3 | 1,1             |     | 0,2              | 0,0 | -0,2 |     | 0,5            | 0,7 | 0,0 |     | /                  | /  | 0,0 |     | /                      | /  | -0,1 |     |
| Interprétation   | B                    | B  | NC <sup>#</sup> |     | B                | B   | NC   |     | B              | B   | NC  |     |                    |    | NC  |     |                        |    | NC   |     |
| Crème aw         | 0,9                  | >3 | >3              |     | 1,1              | 2,0 | >3   |     | 0,9            | 0,9 | 1,1 |     | /                  | /  | 0,2 |     | /                      | /  | 0,1  |     |
| Interprétation   | B                    | B  | B               |     | B                | B   | B    |     | B              | B   | NC  |     |                    |    | NC  |     |                        |    | NC   |     |

\*NI : No Increase, c'est à dire pas d'augmentation de la population microbienne dénombrée à la lecture précédente.

<sup>#</sup>NC: Non-conforme, c'est à dire non-conforme aux critères définis par la pharmacopée européenne.

#### 4. IMPACT D'AGENTS RHEOLOGIQUES SUR L' $a_w$

Les données bibliographiques spécifiant que les hydrocolloïdes telles que par exemple les gommés de xanthane et les gommés de guar peuvent influencer l' $a_w$  [47,51], nous avons sélectionné quelques agents rhéologiques afin d'en évaluer l'impact réel. Les matières premières sélectionnées sont :

- Une gomme de xanthane
- Une gomme de guar
- Une combinaison de deux carraghénanes (proportions 1 :1 m/m)

Les agents rhéologiques sont testés à différentes concentrations dans la formulation du gel. Deux protocoles sont testés (Tableau 26).

**Tableau 26 : description des 2 protocoles appliqués pour la préparation des solutions contenant les agents rhéologiques avant mesure de l' $a_w$  (solutions contenant 10 % de glycérine)**

| Protocoles appliqués pour la formulation des agents rhéologiques |   |
|--|---|
| Protocole témoin   | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Préparer le gel en appliquant le protocole 4, avec 10 % de glycérine</li> </ul>  |
| Protocole avec empâtage  | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Peser la glycérine (10 %)</li> <li>▪ Ajouter l'agent rhéologique sous agitation</li> <li>▪ Peser l'eau et y ajouter la pâte glycérine + agent rhéologique sous agitation</li> <li>▪ Laisser sous agitation jusqu'à ce que l'hydratation soit complète (dissolution des poudres polymériques)</li> <li>▪ Terminer la formulation suivant le protocole témoin</li> </ul> |

Les essais réalisés avec les différents agents rhéologiques ne montrent aucune évolution de l' $a_w$  en fonction de la concentration (voir Figure 19 à Figure 21). Les valeurs restent similaires aux concentrations testées. Il semble donc difficile de jouer sur ce facteur pour abaisser l' $a_w$  avec les matières premières sélectionnées et dans les gammes de concentration testées.

Le protocole par empâtage donne des résultats spécifiques à chaque agent rhéologique. Dans le cas de la gomme de xanthane (Figure 19), l' $a_w$  mesurée ( $0,944 \pm 0,002$ ) est supérieure à celle obtenue par le protocole classique ( $0,930 \pm 0,005$ ). Pour le mélange de carraghénanes (Figure 20), le phénomène inverse est observé avec une  $a_w$  de  $0,938 \pm 0,003$  dans le cas de l'empâtage et  $0,949 \pm 0,010$  sinon. Enfin, concernant la gomme de guar (Figure 21), aucune différence n'est observée entre les deux protocoles.

Néanmoins, nous remarquons qu'en comparaison avec l' $a_w$  du gel témoin ( $0,971 \pm 0,001$ ) les valeurs obtenues avec les gélifiants sont toutes inférieures, les valeurs les plus basses étant obtenues avec la gomme de xanthane. Bien que ce résultat soit intéressant, la substitution de l'agent rhéologique n'est cependant pas applicable dans le cas de cette formulation qui doit répondre à des critères organoleptiques spécifiques que seul le carbomère de la formule témoin confère (transparence et

propriétés gélifiantes). Ce résultat peut cependant être utilisé pour d'autres formulations telles que des émulsions par exemple.

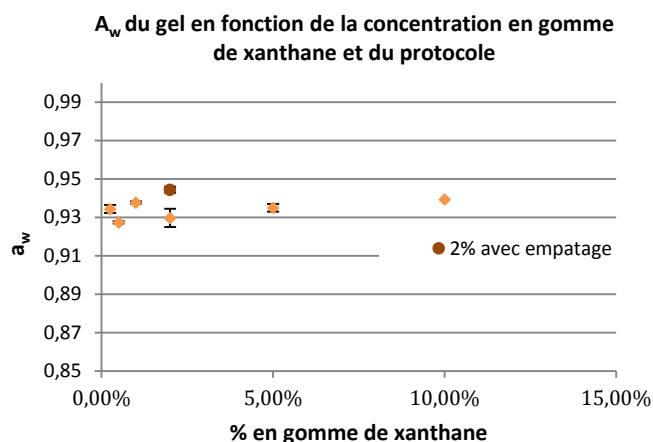


Figure 19 : évolution de l' $a_w$  du gel en fonction de la concentration en gomme de xanthane suivant le protocole 4 et 10 % en glycérine, comparaison à 2 % de polymère avec le protocole par empâtage (T=25°C)

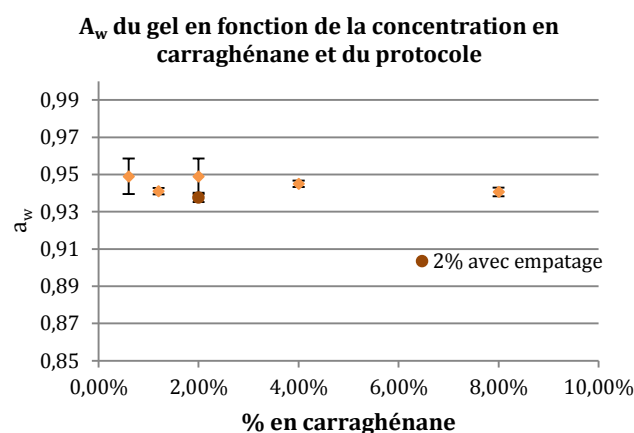


Figure 20 : évolution de l' $a_w$  du gel en fonction de la concentration en carraghénane suivant le protocole 4 et 10 % en glycérine, comparaison à 2 % de polymère avec le protocole par empâtage (T=25°C)

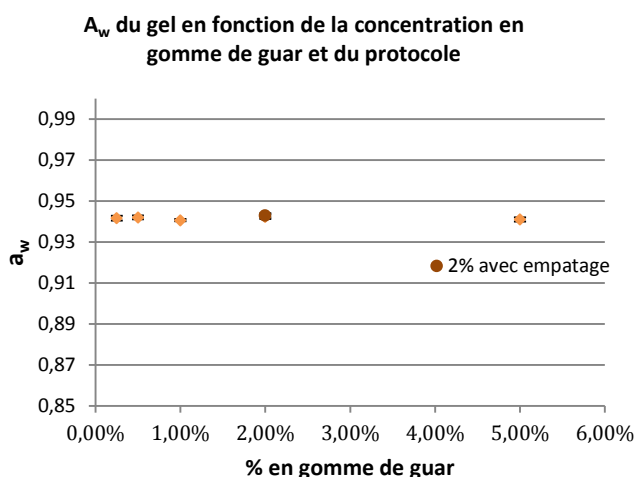


Figure 21 : évolution de l' $a_w$  du gel en fonction de la concentration en gomme de guar suivant le protocole 4 et 10 % en glycérine, comparaison à 2 % de polymère avec le protocole par empâtage (T=25°C)

Ainsi, aux concentrations testées, les agents rhéologiques évalués n'impactent pas l' $a_w$ . Cependant, les valeurs obtenues, comprises entre 0,927 et 0,949, peuvent être d'intérêt pour abaisser l' $a_w$  de certaines formulations compatibles avec ces hydrocolloïdes.

## 5. IMPACT DU PH SUR L' $A_w$

Pour terminer cette étude, nous avons souhaité mesurer l' $a_w$  des formulations en fonction du pH. Les essais ont été effectués pour la lotion, le lait émulsionné à chaud ainsi que la crème hydratante.

Le choix des ajusteurs de pH s'est porté vers l'acide citrique pour acidifier et l'hydroxyde de sodium pour basifier. L'acide citrique nous a paru particulièrement intéressant car il peut jouer un rôle de chélatant dans la formulation.

Les essais réalisés, sur une gamme de pH allant de 4 à 7, ne montrent pas de réel impact sur l'activité de l'eau mesurée pour la lotion et le lait émulsionné à chaud (Figure 22, Figure 23). Les mesures sur les crèmes sont fluctuantes, sans qu'il semble possible d'apporter une interprétation aux résultats obtenus (Figure 24).

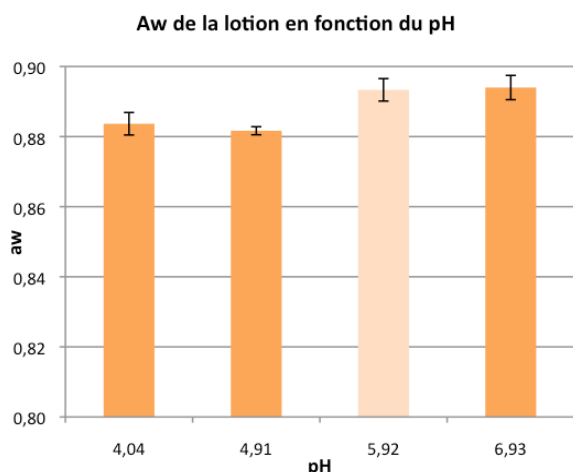


Figure 22 :  $a_w$  mesurées sur la lotion (protocole optimisé, 10 % en butylène glycol) en fonction du pH. La valeur témoin est référée en rose, les valeurs modifiées en orange.

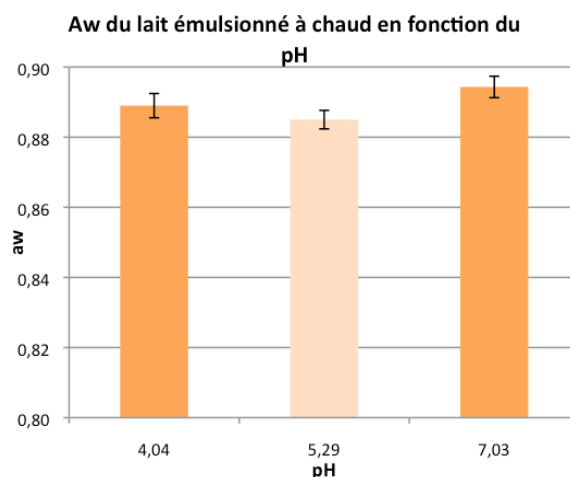


Figure 23 :  $a_w$  mesurées sur le lait émulsionné à chaud (protocole optimisé, 10 % en butylène glycol) en fonction du pH. La valeur témoin est référée en rose, les valeurs modifiées en orange.

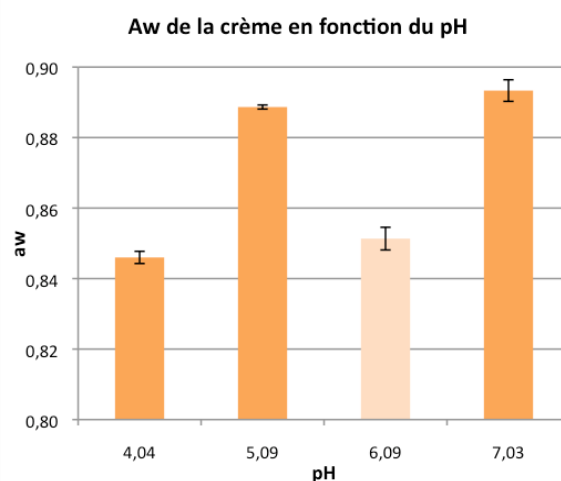


Figure 24 :  $a_w$  mesurées sur la crème (protocole optimisé, 10 % en butylène glycol) en fonction du pH. La valeur témoin est référée en rose, les valeurs modifiées en orange.

Ces mesures ne permettent pas de conclure quant à l'impact du pH sur l' $a_w$  dans la gamme testée.

## PARTIE II : EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES EXTRAITS DE PLANTES SELECTIONNEES DANS LE CADRE DU PROJET

Selon la réglementation cosmétique en vigueur, seules les substances citées dans l'annexe V sont considérées comme conservateur. Toute autre matière première cosmétique présentant des propriétés antimicrobiennes plus ou moins marquées, mais n'apparaissant pas dans la liste positive, ne sont pas à déclarer comme conservateur.

L'étude des propriétés antimicrobiennes d'extraits de plantes et leur utilisation en tant que conservateur dans les produits cosmétiques présentent donc l'intérêt de pouvoir revendiquer un produit sans conservateur, mais également la présence de produit naturel, issu du règne végétal, suivant ainsi la tendance du marché actuel. De plus, les extraits végétaux possédant pour la plupart une ou des activité(s) biologique(s) spécifique(s), il est alors avantageux de mettre en avant la présence de l'extrait dans la formule pour ce potentiel démontré.

D'autre part, les extraits aux solvants organiques ne présentent pas les inconvénients inhérents aux huiles essentielles tels qu'une odeur marquée et parfois rédhibitoire ou encore la présence en grandes quantités d'allergènes cutanés (Figure 25) limitant fortement les concentrations d'utilisations. En effet, bien que les extraits végétaux puissent contenir des traces d'allergènes, ils y sont présents en quantité plus faible que dans les huiles essentielles. En effet, ces molécules volatiles sont plus diluées dans les extraits aux solvants organiques qui contiennent des composés non volatils absents dans les huiles essentielles.

### Les allergènes

Actuellement, la réglementation cosmétique impose l'étiquetage de 26 allergènes lorsqu'ils sont présents dans le produit finis aux taux suivants:

- > 0,001 % dans les produits non rincés
- > 0,01 % dans les produits rincés

Le contrôle de ces substances est exigé car elles ont été identifiées comme potentiellement allergisantes chez certaines personnes sensibles. Il apparaît donc nécessaire d'informer le consommateur de leur présence dans des produits d'usages quotidiens.

Parmi ces substances se trouvent des composés fréquemment rencontrés dans les produits naturels comme l'alcool benzylique, l'eugénol, le géraniol, le linalol, la coumarine ou encore la limonène.

Figure 25 : rappels sur les allergènes en cosmétique [46,206,207]

Dans le cadre du projet NATUBAVAL, plusieurs dizaines de plantes ont été testées pour évaluer leur potentiel antimicrobien. Parmi celles-ci, une dizaine ont montré un potentiel d'intérêt et trois se sont particulièrement démarquées. Pour des raisons de confidentialité (dépôt du brevet BEP140143EP), ces trois plantes seront par la suite nommées plantes A, B et C. Les plantes A et B sont issues du bassin méditerranéen et la plante C est un arbre d'origine tropicale [208].

Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé des extraits de ces trois plantes sélectionnées pour leur potentiel antimicrobien et dont les profils phytochimiques ont été préalablement étudiés. L'étude approfondie de la plante A a permis d'isoler et élucider l'un des principaux actifs responsable de l'activité antimicrobienne. Des tests ont également mis en valeur l'activité antioxydante et chélatante de cet extrait.

## 1. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES EXTRAITS VEGETAUX

Dans cette première phase, les extraits de plantes A et B sont obtenus par macération dans un mélange eau/éthanol 25 : 75 v/v. Les extraits de plantes C sont des résinoïdes obtenus par extraction à l'éthanol. Les plantes C1 et C2 diffèrent par leur variété. Les profils HPLC-UV des quatre extraits de plantes sont représentés Figure 26. L'actif principalement responsable de l'activité antimicrobienne de la plante A est clairement identifié sur le profil correspondant.

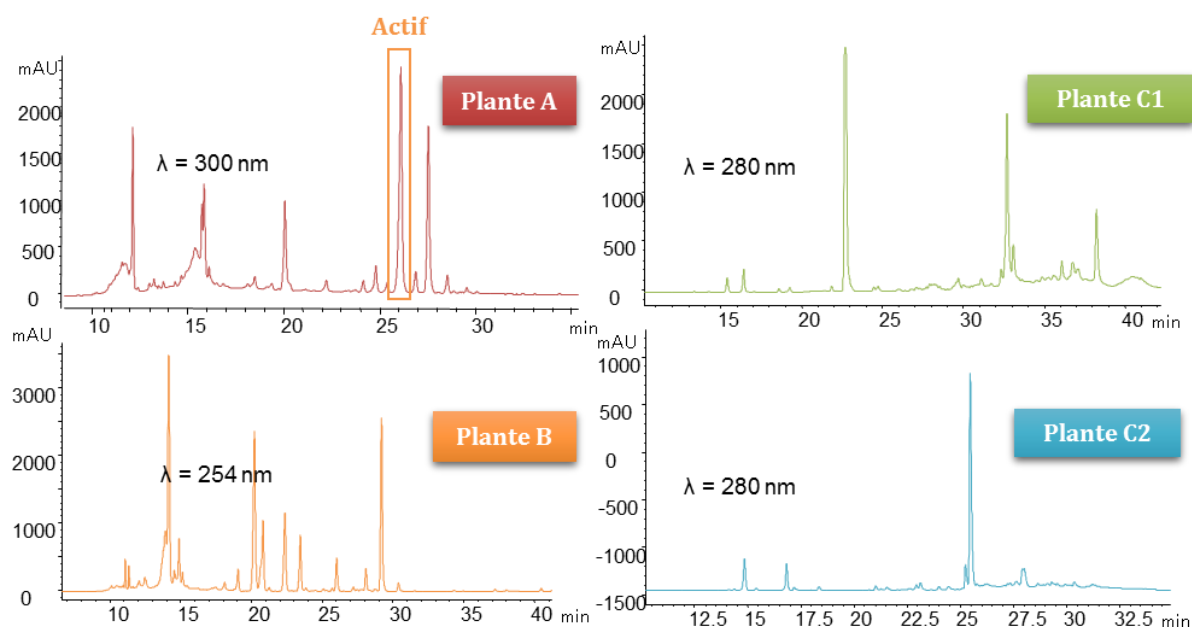


Figure 26 : profils HPLC-UV des plantes A, B, C1, C2. Identification de l'actif principalement responsable de l'activité antimicrobienne de la plante A

### 1.1 Activité antimicrobienne des extraits bruts

Dans une première étape, les extraits ont été testés à deux concentrations – 0,4 % et 0,04 % (concentrations massique en extrait brut) – sur les quatre souches microbiennes contre lesquelles les produits cosmétiques doivent obligatoirement lutter, conformément à la réglementation. Les résultats expriment l'efficacité inhibitrice de l'extrait sur chaque souche à 2 temps de lecture : 24 et 48 h pour les champignons et levures (*C. albicans* et *S. aureus*) et 48 et 72 h pour les bactéries (*A. niger* et *P. aeruginosa*). Les essais ont systématiquement été réalisés sur plusieurs extraits de



plantes récoltées à différentes périodes de l'année sur 2 à 3 ans. Les résultats expriment l'activité moyenne pour chaque extrait. Ils sont exprimés comme suit :

- Inhibition  $\geq 90\%$  : +++
- Inhibition  $\geq 80\%$  et au moins  $\geq 70\%$ \* (\* si diminution au cours du temps) : ++ ou ++\*
- Inhibition  $\geq 60\%$  : +
- Inhibition  $\geq 60\%$  mais perdue au cours du temps : ~
- Inhibition  $< 60\%$  : -

**Tableau 27 : résultats de l'activité antimicrobiennes des extraits des plantes (0,4 % et 0,04 %) sur *A. niger*, *C. albicans*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*.**

| Souches microbiennes        | <i>A. niger</i> |        | <i>C. albicans</i> |        | <i>P. aeruginosa</i> |        | <i>S. aureus</i> |        |
|-----------------------------|-----------------|--------|--------------------|--------|----------------------|--------|------------------|--------|
|                             | 0,4 %           | 0,04 % | 0,4 %              | 0,04 % | 0,4 %                | 0,04 % | 0,4 %            | 0,04 % |
| Plante A                    | +++             | -      | +++                | -      | -                    | -      | +++              | -      |
| Plante B                    | ++              | -      | -                  | -      | ++                   | -      | +++              | -      |
| Plante C1                   | +++             | ~      | ++                 | -      | ++*                  | -      | ++               | -      |
| Plante C2                   | +++             | -      | ++                 | -      | ~                    | -      | -                | -      |
| Témoin commercial : Totarol | ++              | +      | -                  | +      | +++                  | +++    | +++              | +++    |

Dans le Tableau 27, nous notons une excellente activité de la plante A à 0,4 % contre toutes les souches à l'exception de *P. aeruginosa*. Par contre, les plantes B et C1 possèdent une bonne activité contre cette bactérie. Etant donné qu'aucune plante ne présente un spectre d'activité optimal contre les 4 souches, il nous a paru adéquat de combiner leur activité. En effet, certains mélanges d'extraits peuvent parfois générer une activité intensifiée par effet de synergie ou tout simplement une activité cumulée.

**Tableau 28 : résultats de l'activité antimicrobienne des associations de plantes (0,4 % et 0,04 %) sur *A. niger*, *C. albicans*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*.**

| Souches microbiennes                            | <i>A. niger</i> |        | <i>C. albicans</i> |        | <i>P. aeruginosa</i> |        | <i>S. aureus</i> |        |
|---|-----------------|--------|--------------------|--------|----------------------|--------|------------------|--------|
|   | 0,4 %           | 0,04 % | 0,4 %              | 0,04 % | 0,4 %                | 0,04 % | 0,4 %            | 0,04 % |
| PA+PB+PC1 <sup>a)</sup><br>0,375 : 0,375 : 0,25 | +++             | -      | ~                  | -      | -                    | -      | -                | -      |
| PA+PB+PC2<br>0,33 : 0,33 : 0,33                 | ~               | -      | +                  | -      | -                    | -      | ~                | -      |
| PA+PC1<br>0,5 : 0,5                             | +++             | -      | +++                | -      | +                    | -      | +++              | -      |
| PA+PC1<br>0,25 : 0,75                           | +++             | -      | +++                | -      | -                    | -      | ~                | -      |

| Souches microbiennes  | <i>A. niger</i> |        | <i>C. albicans</i> |        | <i>P. aeruginosa</i> |        | <i>S. aureus</i> |        |
|-----------------------|-----------------|--------|--------------------|--------|----------------------|--------|------------------|--------|
| Concentrations        | 0,4 %           | 0,04 % | 0,4 %              | 0,04 % | 0,4 %                | 0,04 % | 0,4 %            | 0,04 % |
| PA+PC2<br>0,5 : 0,5   | ++              | -      | ++                 | -      | +                    | -      | ++               | -      |
| PB+PC1<br>0,25 : 0,75 | +++             | -      | +++                | -      | +++                  | -      | +                | -      |
| PA+PB<br>0,5 : 0,5    | +               | -      | +++                | -      | ++                   | -      | +++              | -      |

<sup>a)</sup> PA : Plante A, PB : Plante B, PC1 : Plante C variété 1, PC2 : Plante C variété 2

Les résultats obtenus avec les associations de plantes sont très hétérogènes. En premier lieu, les associations de 3 plantes ne montrent pas d'activité d'intérêt. Ce résultat est très certainement dû aux concentrations utilisées. En effet, nous avons souhaité que la concentration totale en extrait testé soit constante (0,4 % et 0,04 %). Lorsque nous avons réalisé des mélanges, les concentrations représentatives de chaque extrait de plante étaient donc environ trois à quatre fois plus faibles comme exposé dans le Tableau 28. La faible activité des mélanges peut donc résulter d'un manque d'activité à ces concentrations et/ou d'une absence de synergie.

Les associations des plantes A et C1 et plantes B et C1 donnent les meilleures activités. Ces mélanges sont très actifs à 0,4 % contre les 4 souches microbiennes. Nous notons qu'en faisant varier le *ratio* PA : PC1 de 0,5 : 0,5 à 0,25 : 0,75, nous perdons l'activité contre *P. aeruginosa* et *S. aureus* sans affecter l'excellente activité contre les autres souches. Le mélange de ces deux plantes paraît donc d'intérêt pour la suite des travaux.

Par comparaison, la substitution de la plante C1 avec la C2 ne présente pas autant d'intérêt bien que nous constatons une activité sur les quatre souches également.

La plante B associée à la plante C1 (*ratio* 0,25 : 0,75) présente également un fort intérêt avec une excellente activité sur 3 souches et une activité notable sur *S. aureus*. Ce mélange est aussi à retenir pour la suite des expériences.

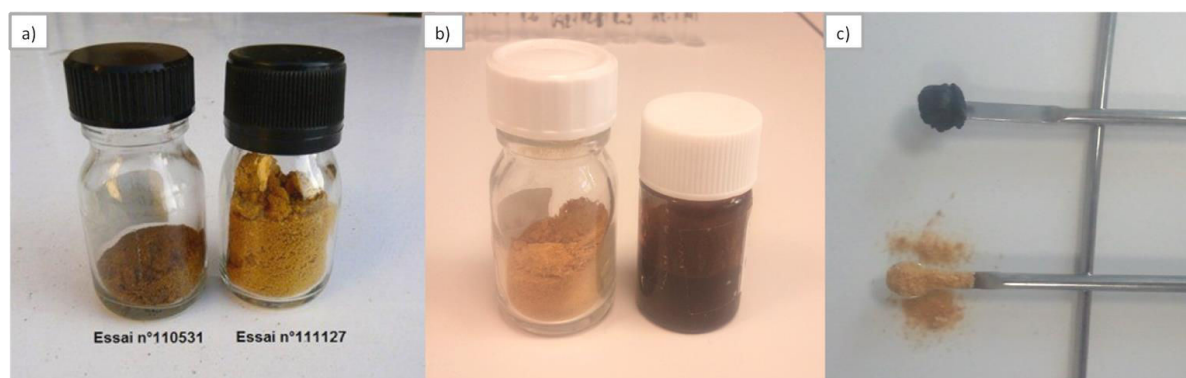
Enfin, la plante B ajoutée à la plante A donne de très bons résultats avec une activité sur toutes les souches. Ce résultat est à retenir pour la suite.

## 1.2 Optimisation de l'extrait de plante A : support solide et décoloration

En raison de la nature du mélange de solvants utilisés (éthanol/eau 75 : 25), les extraits sont de polarité très large. Ils présentent donc souvent des problèmes de solubilité dans les matières premières cosmétiques usuelles. La connaissance des familles de molécules actives en fonction des revendications souhaitées et l'optimisation du procédé d'extraction permettent généralement de trouver des alternatives pour que le produit final soit plus aisément manipulable par le formulateur. L'ajout d'un support solide ou liquide au cours du procédé d'extraction constitue l'une de ces solutions.

De plus, la décoloration est une étape importante de l'optimisation d'un extrait de plante pour une utilisation cosmétique. Les solvants organiques utilisés extraient les molécules responsables de la coloration des plantes. Ce procédé d'extraction produit alors un extrait brut fortement coloré, qui, même incorporé à faibles concentrations dans un produit cosmétique, le colore. Ces extraits ne sont par exemple pas utilisables en « cosmétique blanche », fortement présente sur le marché.

Dans une première partie de l'étude, nous avons donc choisi de préparer l'extrait de plante A sur support solide. De la maltodextrine a été utilisée à cet effet. Aucun test d'activité microbiologique n'a été réalisé sur ces essais (extrait de plante A sur maltodextrine non décoloré). En effet, la décoloration a été engagée en simultanée et les tests d'activité réalisés sur l'extrait de plante A décoloré sur support maltodextrine.



**Figure 27 :** photos de a) deux extraits sur maltodextrine décolorés sur charbon actif, (à gauche) avec 3 % de charbon actif, (à droite) avec 3,6 % de charbon actif, b) (à gauche) un extrait sur maltodextrine décoloré avec 3,6 % de charbon actif et (à droite) un extrait brut non décoloré, sans maltodextrine et c) (en bas) un extrait sur maltodextrine décoloré avec 3,6 % de charbon actif et (en haut) un extrait brut non décoloré, sans maltodextrine.

L'extrait brut de plante A est fortement coloré (Figure 27, b et c), dans les tons brun-vert. L'impact sur la coloration des cosmétiques n'est pas acceptable. Les produits formulés avec 0,5 à 2 % de cet extrait brut présentent une couleur verte non convenable (Figure 28).



**Figure 28 :** photos de crèmes contenant (à gauche) 0,5 % d'extrait brut de plante A non décoloré et (à droite) 2 % d'extrait brut de plante A non décoloré.

Deux techniques de décoloration ont donc été envisagées :

- Décoloration sur charbon actif ;
- Décoloration par distillation moléculaire.

### 1.2.1 Décoloration sur charbon actif

En premier lieu, nous avons testé la décoloration sur charbon actif. Trois grades de charbons actifs ont été comparés : Norit SX, Adsorb pure HP150 et Adsorb pak 1000. Nous avons évalué l'efficacité de la décoloration visuellement et avons sélectionné le Norit SX pour son efficacité comme le montre la Figure 29. Dans un premier temps, les extraits décolorés avec le charbon actif retenu ont tous été préparés avec le support solide choisi : la maltodextrine. L'activité antimicrobienne de l'un de ces extraits a alors été évaluée. Les résultats sont exposés Tableau 28. Nous observons alors une perte importante de l'activité antimicrobienne de l'extrait par comparaison avec les résultats précédemment exposés pour les extraits bruts. L'extrait décoloré ne se montre actif que sur une seule souche, *A. niger*. Afin de comprendre ces résultats, un dosage de l'actif dans les extraits a été engagé. Nous avons ainsi pu comparer les concentrations avant puis après décoloration et mise sur support



Figure 29 : photo des essais de décoloration de l'extrait de plante A à partir de trois charbons actifs.

Tableau 29 : résultats de l'activité antimicrobienne de la plante A décolorée sur support maltodextrine (0,4 % et 0,04 %) sur *A. niger*, *C. albicans*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*.

| Souches microbiennes         | <i>A. niger</i> |        | <i>C. albicans</i> |        | <i>P. aeruginosa</i> |        | <i>S. aureus</i> |        |
|------------------------------|-----------------|--------|--------------------|--------|----------------------|--------|------------------|--------|
| Concentrations               | 0,4 %           | 0,04 % | 0,4 %              | 0,04 % | 0,4 %                | 0,04 % | 0,4 %            | 0,04 % |
| PA décolorée + maltodextrine | +++             | -      | -                  | -      | -                    | -      | -                | -      |

Comme le montre la Figure 30, tous les extraits décolorés, à l'exception de celui récolté en mai 2012, présentent une concentration plus élevée en actif que leur équivalent non décoloré. Nous observons une fluctuation importante de la concentration en actif sur l'année, de  $6,4 \pm 1,0$  à  $51,2 \pm 1,9$  mg d'actif/g d'extrait dans les extraits décolorés. Malheureusement, le dosage de l'actif présent dans l'extrait décoloré testé pour son potentiel antimicrobien n'a pas pu être validé, faute d'épuisement de la matière. Mais nous pouvons émettre l'hypothèse que cet extrait présentait une faible concentration en actif car il a été démontré que l'activité antimicrobienne de l'extrait dépendait fortement

de ce paramètre. Nous pouvons également penser que la décoloration supprime d'autres molécules d'intérêts dans l'activité antimicrobienne. En effet, des extraits de plante A ne contenant pas d'actif ont montré une certaine activité, notamment contre *S. aureus*, démontrant ainsi l'importance de la participation de l'ensemble de l'extrait dans l'activité [208].

La décoloration sur charbon actif apparaît comme une technique d'enrichissement en actif très intéressante. Néanmoins, l'hétérogénéité des résultats obtenus lors des essais nous a encouragés à explorer d'autres techniques de décoloration.

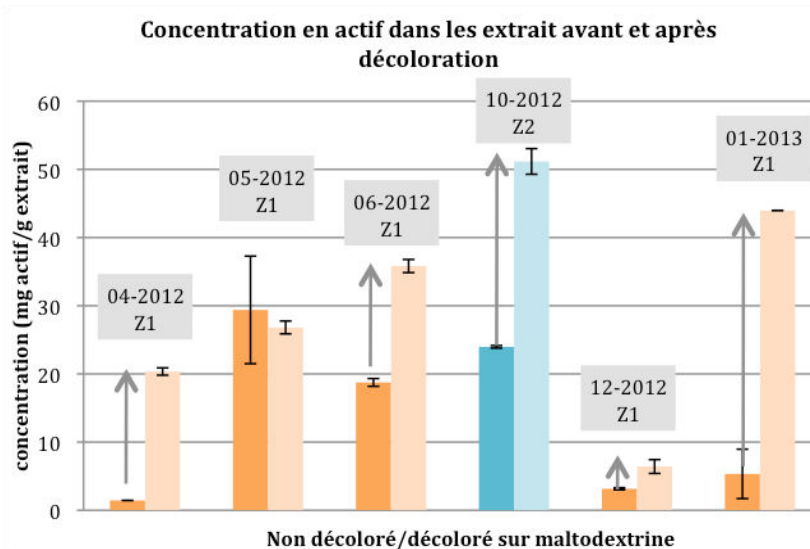


Figure 30 : concentration en actif dans différents extraits EtOH/H<sub>2</sub>O (75 : 25 v/v) avant (couleur foncée) et après décoloration et mise sur support solide (couleur claire). Les extraits ont été obtenus à partir de plantes récoltées entre avril 2012 et janvier 2013. En orange, plantes récoltées dans la zone 1 (Z1) et en bleu, plante récoltée dans la zone 2 (Z2).

### 1.2.2 Solubilisation des extraits

Des essais de solubilisation de cet extrait sur support décoloré ont été effectués afin d'en faciliter l'incorporation en formulations cosmétiques. En effet, l'extrait de plante A sur support maltodextrine n'est pas soluble dans l'eau. Il est donc nécessaire de le présolubiliser avant utilisation.

Afin de définir un solvant ou mélange de solvants permettant d'obtenir une bonne solubilité de l'extrait, nous avons fait un calcul approximatif de la valeur de la constante diélectrique (permittivité relative)  $\epsilon_r$  du mélange de solvants d'extraction et avons cherché un mélange de matières premières cosmétiques ayant la même valeur de permittivité relative. En effet, la constante diélectrique donne une information sur la polarité du milieu. Cette valeur correspond à la réponse d'un milieu soumis à un champ électrique. Au niveau microscopique, elle est donc liée à la polarisabilité électrique des molécules ou atomes [209]. Les valeurs des constantes diélectriques (constantes relatives) des solvants purs sont exposées dans le Tableau 30.

**Tableau 30 : valeurs des constantes diélectriques relatives des liquides purs utilisés pour solubiliser l'extrait de plante A [210]**

| Solvants        | Constante diélectrique<br>$\epsilon_r$ |
|-----------------|--|
| Eau             | 80,1                                   |
| Ethanol         | 25,3                                   |
| Glycérol        | 46,5                                   |
| Propan-1,2-diol | 27,5                                   |
| Propan-1,3-diol | 35,1                                   |
| Butan-1,3-diol  | 28,8                                   |

La constante diélectrique des mélanges a ensuite été calculée par l'équation :

$$\epsilon_r = x_1\epsilon_{r1} + x_2\epsilon_{r2}$$

où  $\epsilon_r$  est la constante diélectrique du mélange de solvants 1 et 2,  $\epsilon_{r1}$  et  $\epsilon_{r2}$ , les constantes diélectriques des solvants purs 1 et 2 respectivement et  $x_1$  et  $x_2$  les fractions volumiques des solvants 1 et 2 dans le mélange ( $x_1+x_2=1$ ) [211].

Selon cette formule, le mélange de solvants d'extraction H<sub>2</sub>O/EtOH 25 : 75 possède une constante diélectrique  $\epsilon_r = 39,0$ .

Le Tableau 31 présente les fractions volumiques de mélanges binaires permettant d'obtenir une permittivité relative de 39,0 à partir des composés exposés dans le Tableau 30.

**Tableau 31 : fractions volumiques des mélanges binaires solutions de l'équation  $\epsilon_r = 39,0$** 

| Solvants |                 | Mélange 1   | Mélange 2   | Mélange 3   | Mélange 4   | Mélange 5   | Mélange 6   |
|----------|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|          |                 | S1+S3       | S1+S4       | S1+S5       | S2+S3       | S2+S4       | S2+S5       |
| S1       | Eau             | <b>0,22</b> | <b>0,09</b> | <b>0,20</b> |             |             |             |
| S2       | Glycérol        |             |             |             | <b>0,60</b> | <b>0,34</b> | <b>0,58</b> |
| S3       | Propan-1,2-diol | <b>0,78</b> |             |             | <b>0,40</b> |             |             |
| S4       | Propan-1,3-diol |             | <b>0,91</b> |             |             | <b>0,66</b> |             |
| S5       | Butan-1,3-diol  |             |             | <b>0,80</b> |             |             | <b>0,42</b> |

Nous avons ensuite solubilisé l'extrait de plante A sur support maltodextrine dans ces différents mélanges. Le mélange 3 n'a pas été testé par manque de matière première (extrait de plante). Nous avons alors choisi de privilégier les mélanges sans eau, l'eau étant la source première des développements microbiens (Figure 31).

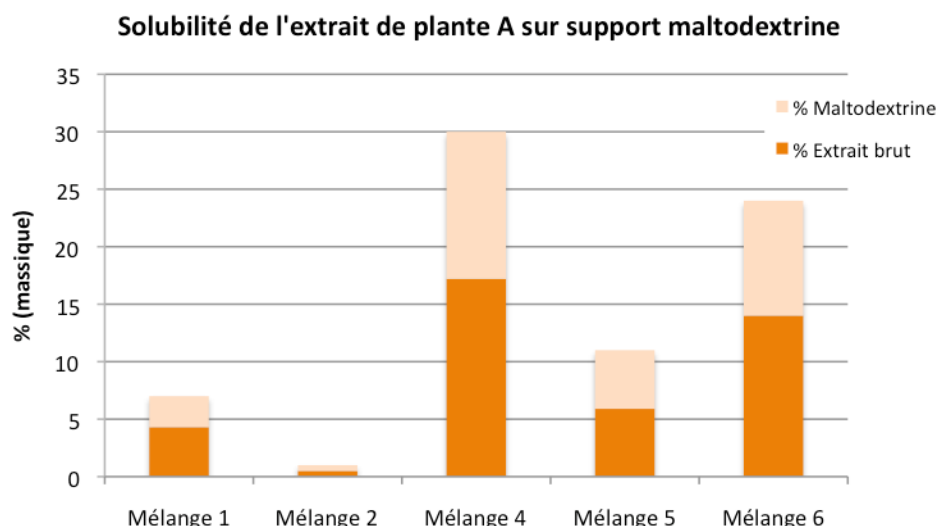


Figure 31 : solubilité de l'extrait de plante A sur support maltodextrine dans les mélanges binaires sélectionnés. En orange foncé apparaissent les pourcentages de solubilité équivalents en extrait brut (sans maltodextrine) ; les pourcentages totaux (orange foncé+clair) correspondent aux pourcentages d'extrait supporté par masse de solvant.

Nous observons que deux mélanges de solvants se distinguent :

- Le mélange 6 composé de glycérol/butan-1,3-diol 58 : 42 v/v permet de solubiliser 24 % d'extrait supporté par masse de solvant, soit 14 % d'extrait brut (sans maltodextrine) par masse de solvant.
- Le mélange 4 composé de glycérol/propan-1,2-diol 60 : 40 v/v permet de solubiliser 30 % d'extrait supporté par masse de solvant, soit 17,2 % d'extrait brut par masse de solvant.

A cette étape, nous pouvons alors sélectionner le mélange glycérol/propan-1,2-diol (G-PG) comme bon solvant de l'extrait de plante A. Néanmoins, nous notons également que l'étape de solubilisation est lente et fastidieuse. Pour obtenir ce résultat, il a été nécessaire d'agiter la solution plusieurs heures (agitation magnétique à 35 °C) en alternant avec 30 min d'ultrasons à chaque ajout d'extrait. De plus, à partir de 20 % en extrait dans le milieu, l'ensemble devient très visqueux et difficile à homogénéiser. En effet, la présence de la maltodextrine augmente la viscosité de la solution. Ce support ne semble donc pas être idéal dans le cadre de ces travaux.

### 1.2.3 Décoloration par distillation moléculaire

La décoloration au charbon actif n'ayant pas donné de résultats d'intérêt, nous avons envisagé une autre technique de décoloration : la distillation moléculaire. Cette technique est une distillation sous vide poussée à température élevée mais avec un temps de contact très court (quelques secondes) entre la matière végétale solubilisée et le matériel de distillation chauffé. Cette technique évite la dénaturation des molécules sensibles à la chaleur. Nous avons appliqué la technique en utilisant un support liquide : un triglycéride à chaînes moyennes.

L'extrait obtenu est liquide et marron-orange translucide comme le montre la Figure 32. La couleur obtenue est très intéressante pour une utilisation cosmétique. De plus, le profil HPLC-UV de cet extrait montre que l'actif d'intérêt y est bien présent.



Figure 32 : photo de l'extrait décoloré obtenu après distillation moléculaire

Malheureusement, les tests d'activité antimicrobiens de cet extrait se sont montrés décevants. Comme le montre le Tableau 32, il n'est actif sur aucune souche, quelque soit la concentration.

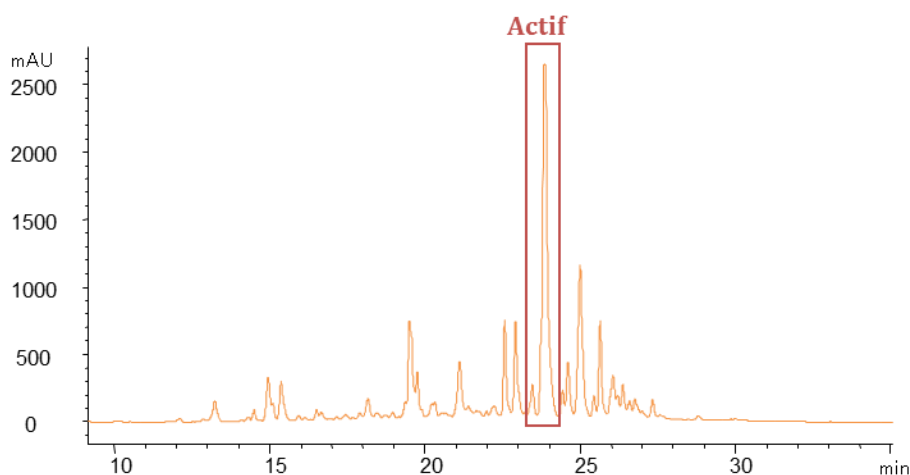


Figure 33 : profil HPLC-UV de l'extrait de plante A décoloré par distillation moléculaire.  $\lambda = 310$  nm

Tableau 32 : résultats de l'activité antimicrobienne de la plante A décolorée par distillation moléculaire (0,4 % et 0,04 %) sur *A. niger*, *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *E. coli*.

| Souches microbiennes | <i>A. niger</i> |        | <i>C. albicans</i> |        | <i>P. aeruginosa</i> |        | <i>S. aureus</i> |        | <i>E. Coli</i> |        |
|----------------------|-----------------|--------|--------------------|--------|----------------------|--------|------------------|--------|----------------|--------|
| Concentrations       | 0,4 %           | 0,04 % | 0,4 %              | 0,04 % | 0,4 %                | 0,04 % | 0,4 %            | 0,04 % | 0,4 %          | 0,04 % |
| PA distillat DM*     | -               | -      | -                  | -      | -                    | -      | -                | -      | -              | -      |

\*DM : Distillation Moléculaire

Nous noterons que cet essai a été réalisé à partir de l'extrait pilote de plante A EtOH/H<sub>2</sub>O qui n'était actif que sur *S. aureus*. Nous pouvons donc seulement conclure à une perte d'activité sur cette souche. Il serait malgré tout intéressant de tester cette technique de décoloration à partir d'un extrait plus actif, afin de conclure sur l'impact réel de la décoloration sur l'activité sur les autres souches.



### 1.3 Activité antimicrobienne de l'extrait de plante A enrichi en actif

Dans les cas où l'on souhaite revendiquer l'activité d'une molécule ou d'un ensemble de molécules présente(s) dans l'extrait, il est souvent nécessaire d'optimiser la technique d'extraction en vue d'augmenter la ou les concentration(s) finale(s) en actif(s). L'objectif ainsi recherché est de limiter la concentration en extrait total dans le produit fini, tout en ayant l'activité nécessaire.

Comme déjà explicité, l'actif participant principalement à l'activité antimicrobienne de la plante A a été défini [208] et nous avons donc réalisé cette optimisation. Les résultats ont montré que l'un des meilleur solvant d'extraction permettant d'obtenir un extrait enrichi en actif est le méthanol (Figure 34).

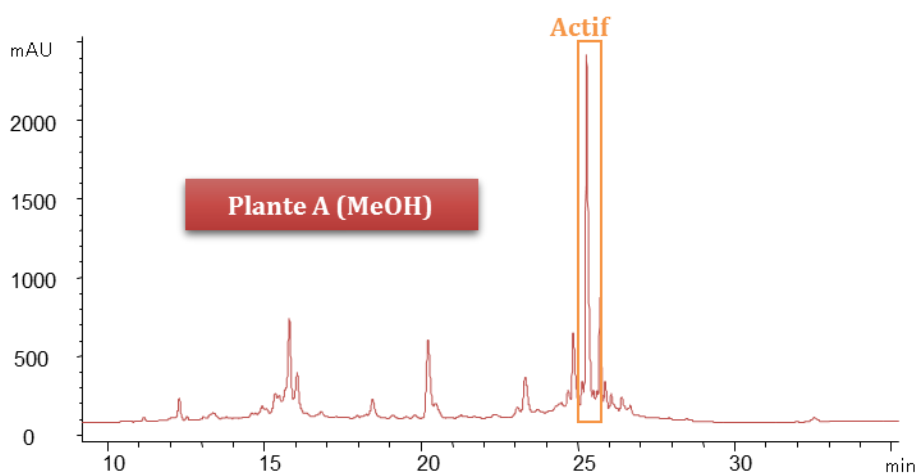


Figure 34 : profil HPLC-UV d'un extrait de plante A MeOH.  $\lambda = 310 \text{ nm}$

Les tests d'activités antimicrobiens réalisés sur un extrait de plante A MeOH (extrait réalisé sur quelques dizaines de grammes de plante fraîche) ainsi que le même extrait réalisé à l'échelle pilote montrent une perte d'activité lors du changement d'échelle (Tableau 33). En effet, les deux extraits présentent une excellente activité contre *A. niger* et *S. aureus* alors qu'aucun des deux n'est actif contre *E. coli*. Par contre, l'extrait réalisé à petite échelle présente une activité notable contre *C. albicans*, alors que nous observons une perte de l'activité de l'extrait pilote contre cette même souche. Enfin, l'extrait réalisé en petite quantité perd l'activité initiale contre *P. aeruginosa* alors que l'extrait pilote ne présente aucune activité contre cette bactérie. Un dosage de l'actif a alors été réalisé sur ces deux extraits. L'extrait réalisé dans les conditions d'optimisation contient  $44,3 \pm 2,6 \text{ mg}$  d'actif/g d'extrait alors que celui réalisé à l'échelle pilote contient  $38,9 \pm 0,9 \text{ mg}$  d'actif/g d'extrait. Nous notons que les deux extraits sont riches en actif, avec des concentrations peu différentes. La légère perte en actif notée peut expliquer en partie la perte d'activité antimicrobienne observée. Mais nous pouvons également penser que le passage à l'échelle pilote peut impacter d'autres composés participant à l'efficacité antimicrobienne.

L'extrait pilote a également été testé associé à la plante C1 avec un ratio 50 : 50 conformément aux bons résultats obtenus précédemment. Malheureusement, nous

observons ici que les résultats sont moins intéressants que prévus puisque l'ensemble n'est pas actif contre 3 souches (*A. niger*, *P. aeruginosa* et *E. coli*). L'activité est notable contre *S. aureus* et bonne contre *C. albicans*. Néanmoins, cette association semble moins intéressante que l'extrait pilote seul.

**Tableau 33 : résultats de l'activité antimicrobienne de la plante A extraite au méthanol et de l'association avec la plante C1 (0,4 % et 0,04 %) sur *A. niger*, *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *E. coli*.**

| Souches microbiennes | <i>A. niger</i> |        | <i>C. albicans</i> |        | <i>P. aeruginosa</i> |        | <i>S. aureus</i> |        | <i>E. Coli</i> |        |
|----------------------|-----------------|--------|--------------------|--------|----------------------|--------|------------------|--------|----------------|--------|
|                      | 0,4 %           | 0,04 % | 0,4 %              | 0,04 % | 0,4 %                | 0,04 % | 0,4 %            | 0,04 % | 0,4 %          | 0,04 % |
| PA MeOH Pilote       | +++             | -      | ~                  | -      | -                    | -      | +++              | -      | -              | -      |
| PA MeOH Labo         | +++             | -      | +                  | -      | ~                    | -      | +++              | -      | -              | -      |
| PA + PC1 50 :50      | -               | -      | ++                 | -      | -                    | -      | +                | -      | -              | -      |

#### 1.4 Activité antimicrobienne de l'extrait de plante A sur support liquide

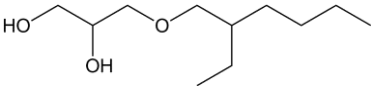
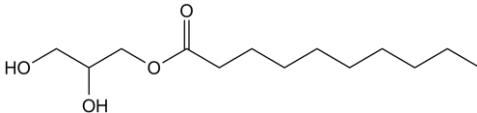
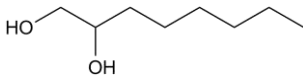
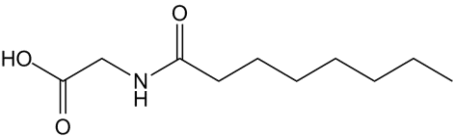
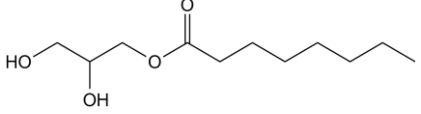
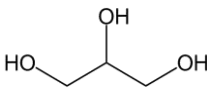
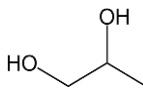
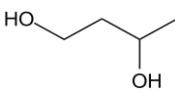
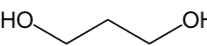
Dans une troisième phase de l'optimisation de l'extrait, nous avons choisi d'ajouter un support liquide cosmétique au cours de l'étape d'extraction de la plante A afin que la matière première extraite soit immédiatement formulable sans étape de préparation préalable. Trois critères de sélection nous ont permis d'orienter les choix de matières premières :

- Etape 1 : Sélection de matières premières possédant des propriétés antifongique et/ou antibactériennes, en privilégiant l'activité sur *P. aeruginosa* ;
- Etape 2 : Suivant les essais réalisés avec les matières premières de l'étape 1, sélection des matières premières solubilisant le mieux l'extrait de plante A (extrait MeOH) ;
- Etape 3 : Redirection des choix suivant les contraintes de disponibilité des matières premières pour la réalisation d'une extraction pilote sur support liquide.

##### **Etape 1**

Les matières premières sélectionnées sont décrites dans le Tableau 34. Toutes ont été sélectionnées en fonction de leur potentiel antimicrobien revendiqué et/ou de leur capacité à abaisser l'activité de l'eau [16,46,212,213,214].

Tableau 34 : formules des matières premières sélectionnées pour leur activité antimicrobienne

| Noms INCI          | Structures  | Formules brutes    | Activité antimicrobienne  |
|--------------------|---|--------------------|---|
| ETHYLHEXYLGLYCERIN |    | $C_{11}H_{24}O_3$  | Activateur des systèmes de conservations<br>Efficace notamment sur les bactéries Gram+                              |
| GLYCERYL CAPRATE   |    | $C_{13}H_{26}O_4$  | Très bonne activité contre Gram+ et levures.<br>Assez bonne activité contre Gram-<br>Insuffisant contre champignons |
| CAPRYLYL GLYCOL    |    | $C_8H_{18}O_2$     | Large spectre antimicrobien. Peu actif contre champignons   |
| CAPRYLOYL GLYCINE  |    | $C_{10}H_{19}NO_3$ | Activité contre les bactéries notamment   |
| GLYCERYL CAPRYLATE |  | $C_{11}H_{22}O_4$  | Très bonne activité contre Gram+, Gram – et les levures.<br>Assez bonne activité contre les champignons             |
| GLYCERIN           |  | $C_3H_8O_3$        | Potentiel antibactérien entre 5 et 20 % et antifongique dès 30 %  |
| PROPYLENE GLYCOL   |  | $C_3H_8O_2$        | Activité antibactérienne et antifongique entre 10 et 20 %   |
| BUTYLENE GLYCOL    |  | $C_4H_{10}O_2$     | Activité antibactérienne et antifongique entre 5 et 20 %  |
| PROPANEDIOL        |  | $C_3H_8O_2$        | Activateur des systèmes de conservation   |

Avant que le solvant d'extraction de la plante A ne soit optimisé (MeOH), nous avons pu tester l'activité antimicrobienne de l'extrait de départ (H<sub>2</sub>O/EtOH 25 : 75) associé à trois de ces matières premières : glycéryl caprylate, glycéryl caprate et caprylyl glycol. Ces trois matières premières (MP) ont systématiquement été mélangées avec la plante A dans des proportions plante A/MP 75 : 25 m/m, suivant les recommandations des fournisseurs. Les résultats (Tableau 35 et Tableau 36) montrent une augmentation de l'activité de la plante A par addition de son activité et de celle des MP associées. Nous n'observons néanmoins pas de synergie d'activité.

**Tableau 35 : activité antimicrobienne des glycéryl caprylate, glycéryl caprate et caprylyl glycol à 0,05 et 0,005 %**

| Souches microbiennes | <i>A. niger</i> |        | <i>C. albicans</i> |        | <i>P. aeruginosa</i> |        | <i>S. aureus</i> |        |
|----------------------|-----------------|--------|--------------------|--------|----------------------|--------|------------------|--------|
| Concentrations       | 0,05%           | 0,005% | 0,05%              | 0,005% | 0,05%                | 0,005% | 0,05%            | 0,005% |
| Glycéryl caprylate   | +++             | -      | ++*                | ~      | -                    | -      | -                | -      |
| Glycéryl caprate     | +++             | -      | +++                | +      | -                    | -      | +++              | -      |
| Caprylyl glycol      | ~               | -      | -                  | -      | -                    | -      | -                | -      |

**Tableau 36 : activité antimicrobienne de la plante A associée aux glycéryl caprylate, glycéryl caprate et caprylyl glycol**

| Souches microbiennes                  | <i>A. niger</i> |        | <i>C. albicans</i> |        | <i>P. aeruginosa</i> |        | <i>S. aureus</i> |        |
|---------------------------------------|-----------------|--------|--------------------|--------|----------------------|--------|------------------|--------|
| Concentrations                        | 0,4 %           | 0,04 % | 0,4 %              | 0,04 % | 0,4 %                | 0,04 % | 0,4 %            | 0,04 % |
| Plante A (PA)                         | +++             | -      | +++                | -      | -                    | -      | +++              | -      |
| PA + glycéryl caprylate<br>87,5 :12,5 | +++             | -      | +                  | ~      | -                    | -      | +++              | -      |
| PA + glycéryl caprate<br>87,5 :12,5   | +++             | ~      | +++                | +      | -                    | -      | +++              | ~      |
| PA + caprylyl glycol<br>87,5 :12,5    | +++             | -      | +++                | -      | -                    | -      | +++              | ~      |

## **Etape 2**

L'extraction de la plante A (extrait MeOH) sur les supports (MP) présentés Tableau 34 a été réalisée par ajout de chaque matière première dans le solvant d'extraction avant évaporation. En effet, le procédé d'extraction de la plante est une macération dans le méthanol suivie d'une concentration sous vide. Mais dans cette étape d'optimisation, nous avons ajouté une matière première (support) au macérât méthanolique avant de le concentrer, et ce afin d'obtenir un produit final liquide. Nous avons testé les 9 MP présentées dans le Tableau 34, et avons donc obtenu 9 produits que nous avons comparés suivant un critère d'homogénéité.

Cette étape a permis de classer les solvants en fonction de leur capacité à solubiliser l'extrait :

ETHYLHEXYLGLYCERINE>GLYCERYL CAPRATE>CAPRYLYL GLYCOL>CAPRYLOYL GLYCINE> GLYCERYL CAPRYLATE>GLYCERINE>PROPYLENE GLYCOL>BUTYLENE GLYCOL>PROPANEDIOL

### **Etape 3**

Une extraction pilote de la plante A a été réalisée afin de finaliser et valider les essais. 4 échantillons différents ont été produits :

- Un extrait brut témoin sans support
- Un extrait sur support éthylhexylglycerin (meilleur solvant sélectionné) : **Support S1**
- Un extrait sur support éthylhexylglycerin/caprylyl glycol (non testé à l'étape 2)= **Support S2**
- Un extrait sur support caprylyl glycol (3<sup>ème</sup> meilleur solvant) : **Support S3**

Le glyceryl caprate (2<sup>ème</sup> meilleur solvant) et le capryloyl glycine (4<sup>ème</sup> meilleur solvant) n'ont pas été considérés car nous n'avons pas suffisamment de ces produits au moment de réaliser l'extraction pilote. Etant en possession d'une matière première susceptible d'être un intermédiaire d'intérêt (mélange éthylhexylglycerin/caprylyl glycol), nous avons choisi de l'utiliser pour l'extraction. Les autres matières premières ont été éliminées par manque de solubilité de l'extrait dans celles-ci.

**Tableau 37 : résultats de l'activité antimicrobienne des extraits pilotes de la plante A MeOH sans (extrait brut) et avec supports liquides (S1 à S3) testés à 0,4 % et 0,04 % sur *A. niger*, *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *E. coli*.**

| Souches microbiennes | <i>A. niger</i> |        | <i>C. albicans</i> |        | <i>P. aeruginosa</i> |        | <i>S. aureus</i> |        | <i>E. Coli</i> |        |
|----------------------|-----------------|--------|--------------------|--------|----------------------|--------|------------------|--------|----------------|--------|
| Concentrations       | 0,4 %           | 0,04 % | 0,4 %              | 0,04 % | 0,4 %                | 0,04 % | 0,4 %            | 0,04 % | 0,4 %          | 0,04 % |
| PA pilote Brut       | +++             | -      | ~                  | -      | -                    | -      | +++              | -      | -              | -      |
| PA pilote S1         | +++             | +      | +++                | -      | ~                    | -      | +++              | -      | ++             | ~      |
| PA pilote S2         | +++             | ~      | ++                 | -      | ++                   | -      | +                | -      | ++             | -      |
| PA pilote S3         | +++             | -      | +++                | -      | +++                  | -      | +++              | -      | +++            | -      |

Les résultats antimicrobiens réalisés sur les 4 extraits pilotes sont très positifs. Par rapport à l'extrait brut déjà discuté, nous observons que chaque support apporte une activité supplémentaire.

- A 0,4 %, l'extrait sur support S1 présente une excellente activité contre *A. niger*, *C. albicans*, *S. aureus* et une très bonne activité contre *E. coli*. Seule l'activité contre *P. aeruginosa* est perdue dans le temps.
- A 0,4 %, l'extrait sur support S2 présente une excellente activité contre *A. niger* et une très bonne activité contre les autres microorganismes.
- L'extrait sur support S3 présente une excellente activité contre tous les microorganismes à 0,4 %.

Nous pouvons également ajouter que le caprylyl glycol doit jouer un rôle important dans l'activité contre *P. aeruginosa*. En effet, l'extrait brut ne présente pas d'activité contre cette souche et l'extrait sur support S1 (éthylhexylglycérine) perd rapidement l'activité notée au départ. Par contre, nous observons une bonne activité avec le support S2 qui contient le mélange de caprylyl glycol et d'éthylhexylglycérine et une excellente activité lorsque le caprylyl glycol est seul. Même si dans cette série le caprylyl glycol n'a pas été testé seul à 0,4 et 0,04 %, nous pouvons nous référer aux résultats obtenus Tableau 35 où il a été testé à 0,05 et 0,005 %. Nous pouvons alors conclure qu'il faut une concentration strictement supérieure à 0,05 % en caprylyl glycol pour pouvoir observer une activité antimicrobienne, seul ou associé à la plante A.

Ainsi, l'extrait sur support S3 est le plus actif et il sera des plus intéressant de comparer ces résultats avec ceux obtenus lors des challenges tests.

### 1.5 Activité antimicrobienne de l'extrait de plante A associé à des agents de chélation

Enfin, dans une dernière série d'essais, nous avons associé les extraits de plante A à des agents de chélation synthétique et naturels, le Na<sub>2</sub>-EDTA<sup>4</sup>, l'acide phytique et le sodium gluconate. En effet, l'ajout d'un agent chélatant est susceptible d'améliorer l'activité antimicrobienne de certains agents en agissant sur la perméabilité et la fluidité des membranes plasmique des pathogènes.

Les essais ont été réalisés sur l'extrait de plante A H<sub>2</sub>O/EtOH et d'excellents résultats ont été obtenus avec l'agent de synthèse Na<sub>2</sub>-EDTA. Seulement, cet agent présente déjà une excellente activité seule, à très faible concentration (0,004 %) (Tableau 38). Nous pouvons donc penser que les résultats obtenus avec la plante A (Tableau 40) sont majoritairement dûs à l'action du Na<sub>2</sub>-EDTA.

**Tableau 38 : activité antimicrobienne des agents de chélation Na<sub>2</sub>-EDTA, acide phytique et gluconate de sodium à 0,04 % et 0,004 %**

| Souches microbiennes | <i>A. niger</i> |        | <i>C. albicans</i> |        | <i>P. aeruginosa</i> |        | <i>S. aureus</i> |        |
|----------------------|-----------------|--------|--------------------|--------|----------------------|--------|------------------|--------|
| Concentrations       | 0,04%           | 0,004% | 0,04%              | 0,004% | 0,04%                | 0,004% | 0,04%            | 0,004% |
| Na <sub>2</sub> EDTA | +++             | +++    | +++                | +++    | +++                  | +++    | +++              | +++    |
| Acide Phytique       | -               | -      | -                  | -      | -                    | -      | -                | -      |
| Gluconate de sodium  | -               | -      | -                  | -      | -                    | -      | -                | -      |

Les agents naturels ne présentent, quant à eux, aucune activité lorsqu'ils sont testés seuls à 0,004 et 0,04 % (Tableau 38) ou à 0,02 et 0,2 % (Tableau 39). L'association de la

<sup>4</sup> Na<sub>2</sub>-EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique disodium

plante A avec l'acide phytique montre que pour un ratio 50 : 50, l'activité observée correspond à celle de la plante A. L'acide phytique ne présente donc pas d'intérêt dans ce cas. Pour un ratio 80 : 20, nous pouvons également penser que l'activité correspond à celle de la plante A sans valeur ajoutée de l'agent de chélation. En effet, même si l'extrait de plante n'a pas été testé à 0,32 % (concentration équivalente en plante A pour le ratio 80 : 20), nous pouvons estimer l'activité à cette concentration proche de celle obtenue à 0,4 % (Tableau 27). De manière inexpliquée, nous observons qu'à 90 : 10, toute activité antimicrobienne est perdue.

**Tableau 39 : activité antimicrobienne de la plante A et des agents de chélation Na<sub>2</sub>-EDTA, acide phytique et gluconate de sodium à 0,2 % et 0,02 %**

| Souches microbiennes | <i>A. niger</i> |       | <i>C. albicans</i> |       | <i>P. aeruginosa</i> |       | <i>S. aureus</i> |       |
|----------------------|-----------------|-------|--------------------|-------|----------------------|-------|------------------|-------|
| Concentrations       | 0,2%            | 0,02% | 0,2%               | 0,02% | 0,2%                 | 0,02% | 0,2%             | 0,02% |
| Plante A             | +++             | -     | -                  | -     | -                    | -     | +++              | -     |
| Acide Phytique       | -               | -     | -                  | -     | -                    | -     | -                | -     |
| Gluconate de sodium  | -               | -     | -                  | -     | -                    | -     | -                | -     |

Enfin, les essais d'association avec le sodium gluconate montrent qu'associé à 50 : 50 avec la plante A, l'activité sur *A. niger* est perdue. L'effet de l'agent chélatant est donc ici négatif. A 80 : 20, l'activité de la plante A semble conservée. De même qu'avec l'acide phytique, nous notons qu'à 90 : 10, toute activité antimicrobienne est perdue sans que nous ne puissions expliquer ce phénomène.

**Tableau 40 : activité antimicrobienne de la plante A associée aux agents de chélation Na<sub>2</sub>-EDTA, acide phytique et gluconate de sodium à 0,4 % et 0,04 %**

| Souches microbiennes            | <i>A. niger</i> |       | <i>C. albicans</i> |       | <i>P. aeruginosa</i> |       | <i>S. aureus</i> |       |
|---------------------------------|-----------------|-------|--------------------|-------|----------------------|-------|------------------|-------|
| Concentrations                  | 0,4%            | 0,04% | 0,4%               | 0,04% | 0,4%                 | 0,04% | 0,4%             | 0,04% |
| PA + Na <sub>2</sub> EDTA 90:10 | +++             | +++   | +++                | ++    | +++                  | +++   | +++              | +++   |
| PA + Acide Phytique 90:10       | -               | -     | -                  | -     | -                    | -     | -                | -     |
| PA + Acide Phytique 80:20       | +++             | -     | +++                | -     | -                    | -     | +++              | -     |
| PA + Acide Phytique 50:50       | +++             | -     | -                  | -     | -                    | -     | +++              | -     |

| Souches microbiennes               | <i>A. niger</i> |       | <i>C. albicans</i> |       | <i>P. aeruginosa</i> |       | <i>S. aureus</i> |       |
|------------------------------------|-----------------|-------|--------------------|-------|----------------------|-------|------------------|-------|
| Concentrations                     | 0,4%            | 0,04% | 0,4%               | 0,04% | 0,4%                 | 0,04% | 0,4%             | 0,04% |
| PA +<br>Gluconate de sodium 90 :10 | -               | -     | -                  | -     | -                    | -     | -                | -     |
| PA +<br>Gluconate de sodium 80 :20 | +++             | ~     | ++                 | -     | -                    | -     | +++              | -     |
| PA +<br>Gluconate de sodium 50 :50 | -               | -     | -                  | -     | -                    | -     | +++              | -     |

Ainsi, les résultats obtenus avec les agents de chélation ne nous ont pas paru d'intérêt pour la suite des essais.

## 2. FORMULATION COSMETIQUE ET CHALLENGE TEST

En parallèle avec les essais microbiologiques des échantillons issus de l'extraction pilote de la plante A, nous avons testé leur incorporation en formulation cosmétique et les avons soumis à des challenges tests.

Dans une première phase de challenges tests, nous avons choisi de tester l'activité des extraits dans un seul type de formulation : une crème hydratante. La formulation de la crème est celle déjà exposée Tableau 18 comme formule témoin. Les conservateurs de synthèse jusqu'alors incorporés dans cette formulation sont dorénavant remplacés par les extraits conservateurs.

Nous avons donc testé les trois extraits sur supports à deux concentrations dans la crème comme décrit Figure 35.

Nous avons également analysé ces extraits à 1 % (% matière sèche ou extrait brut) dans la formulation de la crème hydratante d' $a_w$  optimisée. Ensuite, conformément aux résultats obtenus lors des essais d'associations de plantes (p. 95), nous avons testé les extraits de plante A avec la plante C (origine 1) à 1 % de matière sèche (ratio PA/PC1 35 :65). Les essais réalisés pour l'évaluation en challenge test sont résumés Figure 35.

Dans cette première phase d'essais microbiologiques, nous avons choisi de faire un bilan à 14 jours afin de pouvoir mettre fin aux essais ne donnant pas les résultats escomptés.

### 2.1 Analyse des challenges test

#### 2.1.1 Extraits de plante A sur supports dans la crème témoin

La Figure 35 résume les essais d'incorporation des extraits sur supports S1 à S3 à 0,5 et 2 % de matière sèche (soit 0,5 et 2 % de support). La crème témoin a été étudiée afin d'évaluer l'apport des extraits. De plus, pour chaque essai, un témoin contenant le



support seul à 0,5 ou 2 % a été testé afin d'en mesurer l'impact sur l'activité évaluée. Comme discuté p. 87 le témoin s'avère non conforme à la Pharmacopée Européenne (Ph. Eur.) dès 14 jours, ce qui permet donc de mettre en évidence des résultats positifs par comparaison.

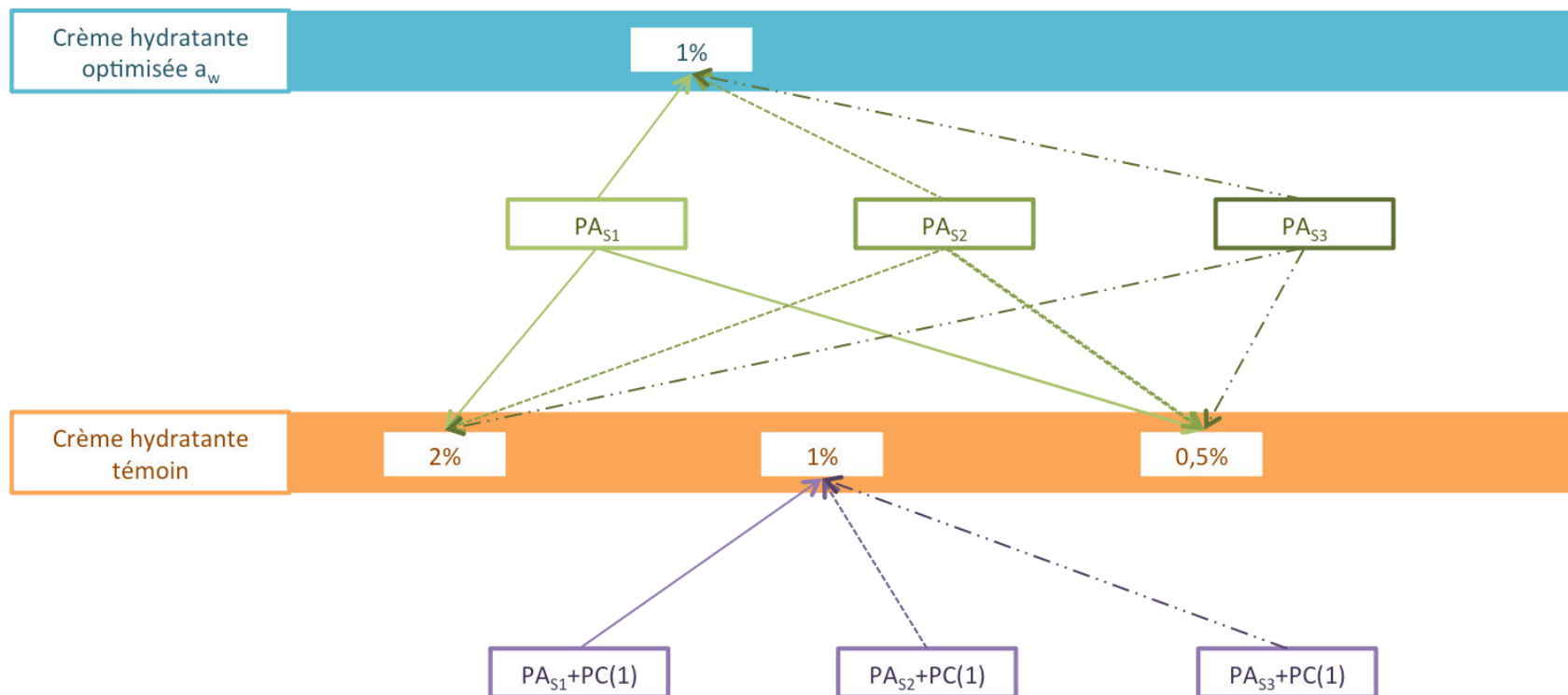


Figure 35 : concentrations en extraits de plantes testés (% matière sèche) en vu des challenges tests dans la crème hydratante témoin et son référent optimisé en a<sub>w</sub>. PA<sub>S1</sub>= Plante A sur support éthylhexylglycerin, PA<sub>S2</sub>= Plante A sur support éthylhexylglycerin/caprylyl glycol, PA<sub>S3</sub> = Plante A sur support caprylyl glycol, PC(1) = Plante C origine 1. Les concentrations indiquées correspondent à la concentration en extrait brut de plantes ou composé.

**Tableau 41 : résultats des challenges tests par incorporation de l'extrait de plante A à différentes concentration dans la crème témoin. Conformité avec les critères Pharmacopée Européenne (réductions logarithmiques et interprétation). Mise en valeur des résultats d'intérêts en vert.**

| Souches             | <i>P. aeruginosa</i> |    |     |     | <i>S. aureus</i> |     |      |     | <i>E. coli</i> |     |     |     | <i>C. albicans</i> |    |     |     | <i>A. brasiliensis</i> |    |      |      |
|---------------------|----------------------|----|-----|-----|------------------|-----|------|-----|----------------|-----|-----|-----|--------------------|----|-----|-----|------------------------|----|------|------|
| Jours               | J2                   | J7 | J14 | J28 | J2               | J7  | J14  | J28 | J2             | J7  | J14 | J28 | J2                 | J7 | J14 | J28 | J2                     | J7 | J14  | J28  |
| <b>Critère A</b>    | ≥2                   | ≥3 | -   | NI* | ≥2               | ≥3  | -    | NI  | ≥2             | ≥3  | -   | NI  | /                  | /  | ≥2  | NI  | /                      | /  | ≥2   | NI   |
| <b>Critère B</b>    | -                    | -  | ≥3  | NI  | -                | -   | ≥3   | NI  | -              | -   | ≥3  | NI  | /                  | /  | ≥1  | NI  | /                      | /  | ≥1   | NI   |
| Témoin              | 1,3                  | >3 | 1,1 |     | 0,2              | 0,0 | -0,2 |     | 0,5            | 0,7 | 0,0 |     | /                  | /  | 0,0 |     | /                      | /  | -0,1 |      |
| Interprétation      | B                    | B  | NC  |     | B                | B   | NC   |     | B              | B   | NC  |     |                    |    | NC  |     |                        |    | NC   |      |
| Témoin S1 2 %       | >3                   | >3 | /   | >3  | >3               | >3  | /    | >3  | >3             | >3  | /   | >3  | /                  | /  | >3  | >3  | /                      | /  | 0,0  | -0,1 |
| Interprétation      | A                    | A  | A   | A   | A                | A   | A    | A   | A              | A   | A   | A   |                    |    | A   | A   |                        |    | NC   | NC   |
| PA <sub>S1</sub> 2% | >3                   | >3 | /   | >3  | >3               | >3  | /    | >3  | >3             | >3  | /   | >3  | /                  | /  | >3  | >3  | /                      | /  | 0,1  | 0,3  |
| Interprétation      | A                    | A  | A   | A   | A                | A   | A    | A   | A              | A   | A   | A   |                    |    | A   | A   |                        |    | NC   | NC   |
| Témoin S2 2 %       | >3                   | >3 | /   | >3  | >3               | >3  | /    | >3  | >3             | >3  | /   | >3  | /                  | /  | >3  | >3  | /                      | /  | 0,1  | 0,1  |
| Interprétation      | A                    | A  | A   | A   | A                | A   | A    | A   | A              | A   | A   | A   |                    |    | A   | A   |                        |    | NC   | NC   |
| PA <sub>S2</sub> 2% | >3                   | >3 | /   | >3  | >3               | >3  | /    | >3  | >3             | >3  | /   | >3  | /                  | /  | >3  | >3  | /                      | /  | 0,9  | 2,0  |
| Interprétation      | A                    | A  | A   | A   | A                | A   | A    | A   | A              | A   | A   | A   |                    |    | A   | A   |                        |    | B    | A    |
| Témoin S3 2 %       | >3                   | >3 | /   | >3  | >3               | >3  | /    | >3  | >3             | >3  | /   | >3  | /                  | /  | >3  | >3  | /                      | /  | 0,4  | 0,9  |
| Interprétation      | A                    | A  | A   | A   | A                | A   | A    | A   | A              | A   | A   | A   |                    |    | A   | A   |                        |    | NC   | NC   |
| PA <sub>S3</sub> 2% | >3                   | >3 | /   | >3  | >3               | >3  | /    | >3  | >3             | >3  | /   | >3  | /                  | /  | >   | >3  | /                      | /  | 2,5  | >3   |
| Interprétation      | A                    | A  | A   | A   | A                | A   | A    | A   | A              | A   | A   | A   |                    |    | A   | A   |                        |    | A    | A    |
| Témoin S1 0,5 %     | >3                   | >3 | >3  |     | 0,1              | 0,6 | 2,8  |     | 2,9            | >3  | >3  |     | /                  | /  | 1,2 |     | /                      | /  | 0,0  |      |
| Interprétation      | A                    | A  | A   |     | B                | B   | B    |     | B              | A   | A   |     |                    |    | B   |     |                        |    | NC   |      |

| Souches               | <i>P. aeruginosa</i> |     |      |     | <i>S. aureus</i> |      |      |     | <i>E. coli</i> |      |      |     | <i>C. albicans</i> |    |     |     | <i>A. brasiliensis</i> |    |     |     |
|-----------------------|----------------------|-----|------|-----|------------------|------|------|-----|----------------|------|------|-----|--------------------|----|-----|-----|------------------------|----|-----|-----|
| Jours                 | J2                   | J7  | J14  | J28 | J2               | J7   | J14  | J28 | J2             | J7   | J14  | J28 | J2                 | J7 | J14 | J28 | J2                     | J7 | J14 | J28 |
| <b>Critère A</b>      | ≥2                   | ≥3  | -    | NI* | ≥2               | ≥3   | -    | NI  | ≥2             | ≥3   | -    | NI  | /                  | /  | ≥2  | NI  | /                      | /  | ≥2  | NI  |
| <b>Critère B</b>      | -                    | -   | ≥3   | NI  | -                | -    | ≥3   | NI  | -              | -    | ≥3   | NI  | /                  | /  | ≥1  | NI  | /                      | /  | ≥1  | NI  |
| PA <sub>S1</sub> 0,5% | 0,8                  | 0,1 | -0,9 |     | 0,0              | -1,1 | -0,8 |     | 0,5            | -1,2 | -1,0 |     | /                  | /  | 0,6 |     | /                      | /  | 0,2 |     |
| Interprétation        | B                    | NC  | NC   |     | B                | NC   | NC   |     | B              | NC   | NC   |     |                    |    | NC  |     |                        |    | NC  |     |
| Témoin S2<br>0,5 %    | >3                   | >3  | /    |     | 0,3              | 0,7  | 2,6  |     | >3             | >3   | /    |     | /                  | /  | 1,1 |     | /                      | /  | 0,1 |     |
| Interprétation        | A                    | A   | A    |     | B                | B    | NC   |     | A              | A    | A    |     |                    |    | B   |     |                        |    | NC  |     |
| PA <sub>S2</sub> 0,5% | >3                   | >3  | /    |     | 0,5              | >3   | >3   |     | >3             | >3   | /    |     | /                  | /  | >3  |     | /                      | /  | 0,1 |     |
| Interprétation        | A                    | A   | A    |     | B                | A    | A    |     | A              | A    | A    |     |                    |    | A   |     |                        |    | NC  |     |
| Témoin S3<br>0,5 %    | >3                   | >3  | /    |     | 0,5              | >3   | >3   |     | >3             | >3   | /    |     | /                  | /  | >3  |     | /                      | /  | 0,0 |     |
| Interprétation        | A                    | A   | A    |     | B                | A    | A    |     | A              | A    | A    |     |                    |    | A   |     |                        |    | NC  |     |
| PA <sub>S3</sub> 0,5% | >3                   | >3  | /    |     | 1,1              | >3   | >3   |     | >3             | >3   | /    |     | /                  | /  | >3  |     | /                      | /  | 0,1 |     |
| Interprétation        | A                    | A   | A    |     | B                | A    | A    |     | A              | A    | A    |     |                    |    | A   |     |                        |    | NC  |     |

(\* / : pas d'abattement minimal requis, NI : pas d'augmentation, NC : non conforme)

**témoin S1 2 %** : crème témoin contenant 2 % de support S1, **PA<sub>S1</sub> 2 %** : crème contenant l'extrait de plante A sur support S1 à 2 %.

Les résultats obtenus avec le support S1 seul montrent que les produits répondent aux critères A contre *P. aeruginosa* et *E. coli* dès 0,5 % et contre *S. aureus* et *C. albicans* à 2 %. De manière surprenante, l'ajout de la plante A à 0,5 % fait disparaître toute activité. Nous avons donc choisi de stopper le challenge test des essais contenant le support S1 et l'extrait à 0,5 % au bout de 14 jours. Avec 2 % de plante A, nous observons exactement les mêmes résultats qu'avec le support seul, à savoir une activité conforme aux critères A sur toutes les souches sauf *A. brasiliensis*. Néanmoins, une légère différence est observée entre le témoin et l'essai contenant la plante. En effet, une reprise de la multiplication cellulaire de la levure est observée à 24 jours dans l'essai témoin alors qu'une décroissance est notée en présence de l'extrait. Néanmoins, ces écarts restent peu significatifs compte tenu de l'erreur sur la mesure (0,3 log). La conclusion sur cet essai est donc la non-conformité du produit à cause de l'absence d'activité contre *A. brasiliensis*.

Les résultats obtenus avec le support S2 seul montrent que, tout comme avec S1, les produits répondent aux critères A contre *P. aeruginosa* et *E. coli* dès 0,5 % et contre *S. aureus* et *C. albicans* à 2 %. L'ajout de la plante A à 0,5 % permet de mettre en évidence l'activité de la plante contre *S. aureus*. En effet, alors que le témoin S2 et l'essai contenant la plante présentaient tout deux une conformité aux critères B à 2 jours, l'activité du témoin chute et n'est plus conforme à 14 jours alors que l'essai contenant l'extrait voit son activité améliorée (conformité au critère A à 14 jours). Ces essais mettent également en évidence l'activité contre *C. albicans* (passage du critère B avec le support au critère A avec la plante). Nous n'avons pas jugé utile de poursuivre les essais à 0,5 % au delà de 14 jours.

A 2 %, les essais mettent en avant l'activité de la plante A contre *A. brasiliensis*. En effet, alors que l'essai témoin n'est pas conforme, une décroissance significative du nombre de spores de la levure est observée dans la crème contenant l'extrait. Alors que la décroissance notée à 14 jours était de 0,9 log, elle est de 2 log à 28 jours. Nous pouvons donc conclure à une conformité selon les critères B de la pharmacopée pour cet essai tout en retenant que l'activité contre *A. brasiliensis* est seulement plus lente.

Les résultats obtenus avec le support S3 montrent que les produits répondent au critère A contre toutes les souches sauf *A. brasiliensis* à 14 jours dès 0,5 % et de même à 2 %. L'apport de la plante A à 0,5 % améliore l'activité contre *S. aureus*. A 2 %, l'extrait permet d'obtenir une activité conforme aux critères A sur toutes les souches. Cet essai est donc conforme à la Ph. Eur. et répond à nos attentes dans l'avancée du projet.

Ainsi, dans le cadre de cette première série, deux essais se distinguent particulièrement, à savoir les crèmes contenant 2 % d'extraits de plante A sur supports S2 et S3. **La crème témoin contenant l'extrait sur support S2 à 2 % est conforme aux critères A de la Ph. Eur sur *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, et *C. albicans* et conforme aux critères B sur *A. brasiliensis*. La crème contenant l'extrait sur support S3 à 2 % est conforme aux critères A de la Ph. Eur sur toutes les souches. Enfin, l'essai contenant l'extrait**

**sur support S1 à 2 % est également intéressant car conforme sur toutes les souches sauf *A. brasiliensis*.**

### 2.1.2 Extraits de plante A sur supports dans la crème optimisée en $a_w$

La deuxième série d'essais est résumée Tableau 42 et réunit les résultats obtenus à partir de la crème optimisée en  $a_w$  (10 % de glycérine selon le protocole optimisé, voir p. 84) dans laquelle ont été incorporés les extraits de plante A sur les trois supports à 1 % de matière sèche. Comme déjà discuté, le témoin optimisé en  $a_w$  présente déjà une activité intéressante contre *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Il sera donc moins aisé de conclure sur l'apport d'activité des extraits sur ces souches.

L'ajout de l'extrait sur support S1 permet d'obtenir des résultats conformes aux critères A pour toutes les souches, sauf pour *A. brasiliensis* contre laquelle le produit répond au critère B à 14 jours. Sachant qu'à 0,5 %, le support S1 donne des résultats conformes aux critères A pour *P. aeruginosa* et *E. coli*, nous pouvons certainement attribuer l'activité au support. Ayant observé qu'avec 2 % de support S1, nous obtenions des résultats conformes aux critères A sans l'extrait, nous ne pouvons conclure ici sur l'apport du support et de la plante à 1 %. Nous pouvons néanmoins penser que l'activité contre *A. brasiliensis* est bien procurée par l'extrait de plante A. Cet essai conserve sa conformité aux critères B à 28 jours contre *A. brasiliensis*. La conclusion sur cette crème est donc une conformité globale aux critères B.

L'ajout de l'extrait sur support S2 génère un produit conforme aux critères A pour toutes les souches, sauf pour *A. brasiliensis* contre laquelle le produit n'est pas conforme à 14 jours. Ayant déjà constaté que le support S2 apporte une activité correspondante aux critères A contre *P. aeruginosa* et *E. coli* dès 0,5 %, nous ne pouvons conclure sur l'apport de l'extrait. De plus, à 2 % de support S2, l'activité contre *S. aureus* et *C. albicans* est conforme aux critères A, aussi ne nous est-il pas possible d'évaluer la valeur ajoutée de la plante A, notamment sur *C. albicans*. L'activité n'étant pas suffisante contre *A. brasiliensis*, ce produit n'est pas validé.

Enfin, l'ajout de l'extrait sur support S3 donne un produit conforme aux critères A pour toutes les souches, sauf pour *A. brasiliensis* contre laquelle le produit n'est pas conforme à 14 jours. Ces résultats sont les mêmes que ceux apportés par seulement 0,5 % de support S3. Nous pouvons néanmoins valider l'apport de la plante sur *A. brasiliensis*. En effet, même si la réduction logarithmique mesurée (0,6) rend le produit non conforme, ce résultat reste meilleur que celui mesuré avec 2 % de support S3 (0,4). De plus, nous observons une diminution du nombre de spores de cette levure entre 14 et 28 jours. La décroissance logarithmique notée à 28 jours est d'intérêt et montre que l'activité contre cette souche est trop lente pour entrer dans les critères de la réglementation mais peut s'avérer d'intérêt dans l'optimisation de produits.

**Ainsi, l'essai contenant l'extrait sur support S1 se distingue ici en répondant aux critères B de la Ph. Eur..**

**Tableau 42 : résultats des challenges tests par incorporation de l'extrait de plante A à 1 % dans la crème optimisée en a<sub>w</sub>. Conformité avec les critères Pharmacopée Européenne (réductions logarithmiques et interprétation)**

| Souches                          | <i>P. aeruginosa</i> |    |     |     | <i>S. aureus</i> |     |     |     | <i>E. coli</i> |     |     |     | <i>C. albicans</i> |    |     |     | <i>A. brasiliensis</i> |    |     |     |
|----------------------------------|----------------------|----|-----|-----|------------------|-----|-----|-----|----------------|-----|-----|-----|--------------------|----|-----|-----|------------------------|----|-----|-----|
| Jours                            | J2                   | J7 | J14 | J28 | J2               | J7  | J14 | J28 | J2             | J7  | J14 | J28 | J2                 | J7 | J14 | J28 | J2                     | J7 | J14 | J28 |
| <b>Critère A</b>                 | ≥2                   | ≥3 | -   | NI  | ≥2               | ≥3  | -   | NI  | ≥2             | ≥3  | -   | NI  | /                  | /  | ≥2  | NI  | /                      | /  | ≥2  | NI  |
| <b>Critère B</b>                 | -                    | -  | ≥3  | NI  | -                | -   | ≥3  | NI  | -              | -   | ≥3  | NI  | /                  | /  | ≥1  | NI  | /                      | /  | ≥1  | NI  |
| Témoin a <sub>w</sub>            | 0,9                  | >3 | >3  |     | 1,1              | 2,0 | >3  |     | 0,9            | 0,9 | 1,1 |     | /                  | /  | 0,2 |     | /                      | /  | 0,1 |     |
| Interprétation                   | B                    | A  | A   |     | B                | B   | A   |     | B              | B   | NC  |     |                    |    | NC  |     |                        |    | NC  |     |
| PA <sub>S1a<sub>w</sub></sub> 1% | >3                   | >3 | /   | >3  | >3               | >3  | >3  | >3  | >3             | >3  | /   | >3  | /                  | /  | >3  | >3  | /                      | /  | 0,8 | 0,9 |
| Interprétation                   | A                    | A  | A   | A   | A                | A   | A   | A   | A              | A   | A   | A   |                    |    | A   | A   |                        |    | B   | B   |
| PA <sub>S2a<sub>w</sub></sub> 1% | >3                   | >3 | /   | >3  | >3               | >3  | /   | >3  | >3             | >3  | /   | >3  | /                  | /  | >3  | >3  | /                      | /  | 0,1 | 0,3 |
| Interprétation                   | A                    | A  | A   | A   | A                | A   | A   | A   | A              | A   | A   | A   |                    |    | A   | A   |                        |    | NC  | NC  |
| PA <sub>S3a<sub>w</sub></sub> 1% | >3                   | >3 | /   | >3  | >3               | >3  | /   | >3  | >3             | >3  | /   | >3  | /                  | /  | >3  | >3  | /                      | /  | 0,6 | 0,9 |
| Interprétation                   | A                    | A  | A   | A   | A                | A   | A   | A   | A              | A   | A   | A   |                    |    | A   | A   |                        |    | NC  | B   |

(\* / : pas d'abattement minimal requis, NI : pas d'augmentation, NC : non conforme)

**témoin a<sub>w</sub>** : crème optimisée en a<sub>w</sub>, **PA<sub>S1a<sub>w</sub></sub> 1 %** : crème optimisée en a<sub>w</sub> contenant l'extrait de plante A sur support S1 à 1 %.

### 2.1.3 Extraits de plante A sur supports et plante C1 dans la crème témoin

Dans cette troisième série, les extraits de plante A ont été associés à l'extrait de plante C1 selon un ratio 35 : 65. Nous avons testé ce complexe de plantes à 1 % de matière sèche dans la crème témoin. Les résultats sont exposés Tableau 43. Pour chacun de ces essais, nous avons réalisé un témoin contenant systématiquement le mélange de supports de la plante A et de la plante C1 à 1 %.

L'essai témoin réalisé avec le support S1 montre une conformité aux critères A à 14 jours contre *P. aeruginosa* et *E. coli*, aux critères B contre *C. albicans* et une non conformité pour les deux souches restantes. Ces mêmes résultats (sauf pour *S. aureus*) étaient observés avec 0,5 % de support S1 seul. Nous pouvons donc peut être lui attribuer ces résultats. L'ajout des extraits génère une reprise de la croissance sur toutes les bactéries, rendant le produit non conforme. Ce résultat coïncide avec ce que nous avons déjà observé dans le cas de l'extrait de plante A sur support S1 à 0,5 %. Nous notons par contre une amélioration de l'activité contre *A. brasiliensis* (critères B). Ce résultat n'ayant pas été observé dans le cas de la plante A sur support S1 à 0,5 %, nous pouvons certainement attribuer l'activité à la plante C1 et émettre l'hypothèse d'une synergie du mélange contre cette souche. Considérant l'ensemble de ces résultats, nous avons décidé de mettre fin au challenge test au bout de 14 jours.

L'essai témoin réalisé avec le support S2 montre une conformité aux critères A à 14 jours contre *P. aeruginosa* et *E. coli*, aux critères B contre *C. albicans* et une non conformité pour les deux souches restantes. Ces résultats sont les mêmes que ceux que nous avons noté avec le support S2 seul à 0,5 %. Nous pouvons donc peut être lui attribuer ces résultats. L'ajout des extraits améliore l'activité contre *S. aureus* (critère A), *E. coli* (critère A dès 2 jours contre critère B pour le témoin) et contre *C. albicans* (critère A). Aucune amélioration n'est cependant observée contre *A. brasiliensis*. Ces résultats étant les mêmes que ceux observés avec l'extrait de plante A sur support S2 seul à 0,5 %, il n'est pas possible de conclure sur la participation des deux extraits à l'activité. La conclusion pour cet essai est que le produit n'est pas conforme.

L'essai témoin réalisé avec le support S3 montre une conformité aux critères A à 14 jours contre toutes les souches sauf *A. brasiliensis*. Ces résultats sont les mêmes que ceux que nous avons noté avec le support S3 seul à 0,5 %. Nous pouvons donc peut être lui attribuer ces résultats. L'ajout des extraits permet d'améliorer l'activité contre *S. aureus* et *E. coli*. Nous n'avons pas observé cette amélioration avec la plante A sur support S3 seul à 0,5 %. Nous pouvons donc penser que ce résultat découle de la présence de la plante C1. Nous notons ensuite une évolution négative sur *C. albicans*. En effet, l'essai était conforme aux critères A à 14 jours mais une reprise de la croissance fongique est observée à 28 jours, rendant le produit non conforme.



**Tableau 43 : résultats des challenges tests par incorporation de l'extrait de plante A et plante C à 1 % dans la crème témoin. Conformité avec les critères Pharmacopée Européenne (réductions logarithmiques et interprétation)**

| Souches                              | <i>P. aeruginosa</i> |      |     |     | <i>S. aureus</i> |      |      |     | <i>E. coli</i> |      |      |     | <i>C. albicans</i> |    |     |     | <i>A. brasiliensis</i> |    |      |     |
|--------------------------------------|----------------------|------|-----|-----|------------------|------|------|-----|----------------|------|------|-----|--------------------|----|-----|-----|------------------------|----|------|-----|
| Jours                                | J2                   | J7   | J14 | J28 | J2               | J7   | J14  | J28 | J2             | J7   | J14  | J28 | J2                 | J7 | J14 | J28 | J2                     | J7 | J14  | J28 |
| <b>Critère A</b>                     | ≥2                   | ≥3   | -   | NI  | ≥2               | ≥3   | -    | NI  | ≥2             | ≥3   | -    | NI  | /                  | /  | ≥2  | NI  | /                      | /  | ≥2   | NI  |
| <b>Critère B</b>                     | -                    | -    | ≥3  | NI  | -                | -    | ≥3   | NI  | -              | -    | ≥3   | NI  | /                  | /  | ≥1  | NI  | /                      | /  | ≥1   | NI  |
| Témoin                               | 1,3                  | >3   | 1,1 |     | 0,2              | 0,0  | -0,2 |     | 0,5            | 0,7  | 0,0  |     | /                  | /  | 0,0 |     | /                      | /  | -0,1 |     |
| Interprétation                       | B                    | B    | NC  |     | B                | B    | NC   |     | B              | B    | NC   |     |                    |    | NC  |     |                        |    |      | NC  |
| Témoin S1S4<br>1 %                   | >3                   | >3   | /   |     | 0,2              | 0,2  | 1,2  |     | 1,7            | >3   | /    |     | /                  | /  | 0,9 |     | /                      | /  | 0,4  |     |
| Interprétation                       | A                    | A    | A   |     | B                | B    | NC   |     | B              | A    | A    |     |                    |    | B   |     |                        |    |      | NC  |
| PA <sub>S1</sub> PC <sub>S4</sub> 1% | 1,8                  | -0,6 | 0,1 |     | 1,8              | -0,9 | -0,7 |     | 2,7            | -0,9 | -0,6 |     | /                  | /  | 0,7 |     | /                      | /  | 0,8  |     |
| Interprétation                       | B                    | NC   | NC  |     | B                | NC   | NC   |     | B              | NC   | NC   |     |                    |    | B   |     |                        |    |      | B   |
| Témoin S2S4<br>1 %                   | >3                   | >3   | /   |     | 0,3              | 0,7  | 2,7  |     | 2,8            | >3   | >3   |     | /                  | /  | 1,5 |     | /                      | /  | 0,1  |     |
| Interprétation                       | A                    | A    | A   |     | B                | B    | NC   |     | B              | A    | A    |     |                    |    | B   |     |                        |    |      | NC  |
| PA <sub>S2</sub> PC <sub>S4</sub> 1% | >3                   | >3   | /   | >3  | 2,7              | >3   | /    | >3  | >3             | >3   | /    | >3  | /                  | /  | >3  | >3  | /                      | /  | -0,1 | 0,0 |
| Interprétation                       | A                    | A    | A   | A   | B                | A    | A    | A   | A              | A    | A    | A   |                    |    | A   | A   |                        |    |      | NC  |
| Témoin S3S4<br>1 %                   | >3                   | >3   | /   |     | 0,3              | 1,2  | >3   |     | 2,5            | >3   | >3   |     | /                  | /  | >3  |     | /                      | /  | 0,3  |     |
| Interprétation                       | A                    | A    | A   |     | B                | B    | A    |     | B              | A    | A    |     |                    |    | A   |     |                        |    |      | NC  |
| PA <sub>S3</sub> PC <sub>S4</sub> 1% | >3                   | >3   | /   | >3  | >3               | >3   | >3   | >3  | >3             | >3   | /    | >3  | /                  | /  | 2,9 | 1,4 | /                      | /  | 0,4  | 0,4 |
| Interprétation                       | A                    | A    | A   | A   | A                | A    | A    | A   | A              | A    | A    | A   |                    |    | A   | NC  |                        |    |      | NC  |

### 2.1.4 Conclusion

Cette première série d'essais a permis de mettre en évidence que la souche contre laquelle les extraits sont les moins actifs est *A. brasiliensis*. Ce résultat peut surprendre car l'extrait de plante A s'est toujours montré très actif sur ce champignon. Nous savons néanmoins que ce champignon, sous forme de spore, est résistant et qu'il est fréquent que les nouveaux conservateurs soient moins actifs contre celui-ci [215]. Les différences observées entre les résultats obtenus lors des essais antimicrobiens de l'extrait de plante A et les challenge test peuvent être dues aux différences de conditions opératoires entre les essais.

Trois essais se sont particulièrement distingués. Un produit présente une **conformité aux critères A de la Ph. Eur. sur les cinq souches**. Il s'agit de la crème témoin contenant l'extrait de **plante A sur support S3**. Cet essai met particulièrement en évidence l'activité de l'extrait sur *A. brasiliensis*. L'essai contenant l'extrait de la **plante A sur support S2** est tout à fait intéressant également car il s'avère conforme aux critères A sur 4 souches et aux **critères B** sur *A. brasiliensis* avec une augmentation de la décroissance sur cette levure entre 14 et 28 jours. Enfin, l'essai contenant l'extrait de plante A sur support S1 formulé dans la **crème optimisée** en  $a_w$  se montre prometteur car il présente une conformité aux critères A sur les 3 bactéries et le champignon tout en étant conforme aux **critères B** sur *A. brasiliensis*.

Nous observons globalement que les supports liquides choisis participent de manière conséquente à l'activité notamment contre les bactéries. Ces résultats ne nous permettent donc pas d'évaluer l'apport des extraits sur ces micro-organismes. Nous observons par ailleurs que la souche qui se montre la plus résistante dans nos essais est *A. brasiliensis*. Cette résistance nous a alors permis de différencier les essais et de valider les trois plus prometteurs pour poursuivre le développement d'un ingrédient antimicrobien pour l'industrie cosmétique. Les essais suivants devront alors être réalisés sur un extrait décoloré, étape nécessaire pour la commercialisation. Enfin, il restera à définir les concentrations d'utilisation puis à élargir les essais à d'autres formes de produits cosmétiques (lotions, gels, gels douches, shampoings, masques...). Enfin, si le support S3 est effectivement conservé il faudra considérer sa toxicité potentielle lorsqu'il est incorporé à en concentration supérieure à 0,5 % en formulations cosmétiques.

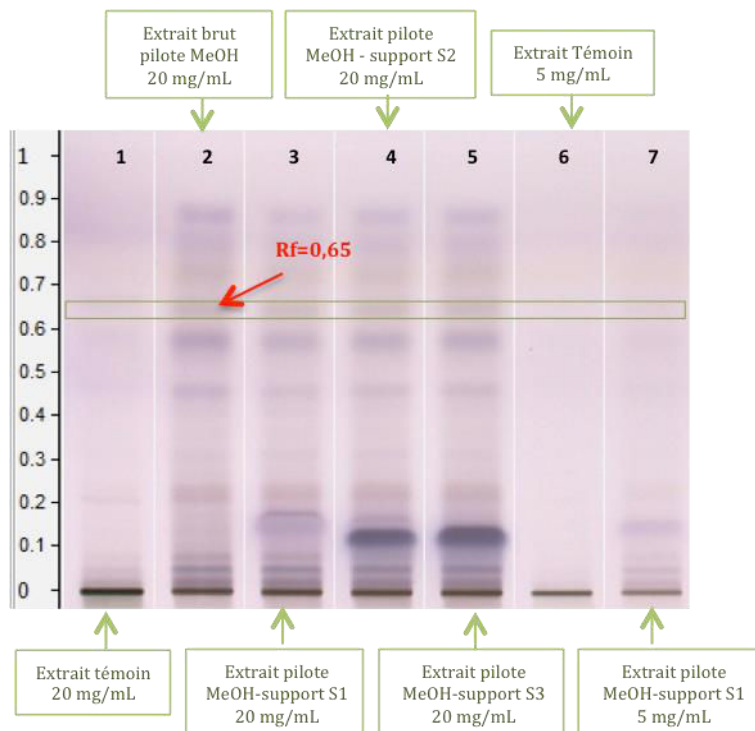
## 3. DOSAGE DE L'ACTIF DE LA PLANTE A EN FORMULATION COSMETIQUE

Afin de contrôler la consommation de l'actif de l'extrait de plante A après incorporation en formulation cosmétique, une méthode de dosage a été développée par HPTLC.

### 3.1 Développement de la méthode

Dans une première étape, une méthode classique de caractérisation des végétaux a été utilisée afin de détecter l'actif d'intérêt. Cette méthode utilise une phase mobile

composée de toluène/acétate d'éthyle/acide formique 70:30:1 (v/v/v) pour le développement de la plaque suivi d'une révélation à l'anisaldéhyde. Il s'agit ici d'une phase mobile classique pour la migration des composés de type flavonoïdes apolaires. Le révélateur est, quant à lui, caractéristique des terpénoïdes, saponines, stérols et composés lipophiles [216].



**Figure 36 :** plaque HPTLC observée en lumière blanche après révélation à l'anisaldéhyde d'échantillons d'extrait de plante A (1) de référence EtOH/H<sub>2</sub>O 75 :25 à 20 mg/mL (dépôt 2  $\mu$ L), (2) pilote MeOH brut à 20 mg/mL (dépôt 2  $\mu$ L), (3) pilote MeOH sur support S1 à 20 mg/mL (dépôt 2  $\mu$ L), (4) pilote MeOH sur support S2 à 20 mg/mL (dépôt 2  $\mu$ L), (5) pilote MeOH sur support S3 à 20 mg/mL (dépôt 2  $\mu$ L), (6) de référence EtOH/H<sub>2</sub>O 75 :25 à 5 mg/mL (dépôt 2  $\mu$ L) et (7) pilote MeOH sur support S1 à 5 mg/mL (dépôt 2  $\mu$ L).

L'actif, bien isolé, apparaît après révélation à l'anisaldéhyde en vert sur la plaque, avec un rapport frontal (Rf) de 0,65 (Figure 36). Celui-ci a été préalablement identifié par application de l'actif isolé selon cette même méthode (isolement de l'actif par HPLC semi-préparative et identification par RMN).

Nous avons alors analysé les matrices cosmétiques avec et sans actif suivant cette méthode. Dans un premier temps, nous avons déposé 20  $\mu$ L des matrices cosmétiques pour 2  $\mu$ L d'échantillons témoin d'extrait (Figure 37). En effet, les produits cosmétiques testés contiennent 2 ou 0,5 % d'extrait de plante A mais sont dilués par 10 avant d'être déposés sur la plaque. Nous avons donc déposé 20  $\mu$ L pour comparer qualitativement la présence de l'actif dans les produits et l'extrait. Seulement, nous remarquons que ces concentrations sont trop élevées car ne permettent pas une bonne séparation ni une bonne résolution des composés élués à des Rf supérieurs à 0,65. Nous observons alors une co-élution avec l'actif recherché.

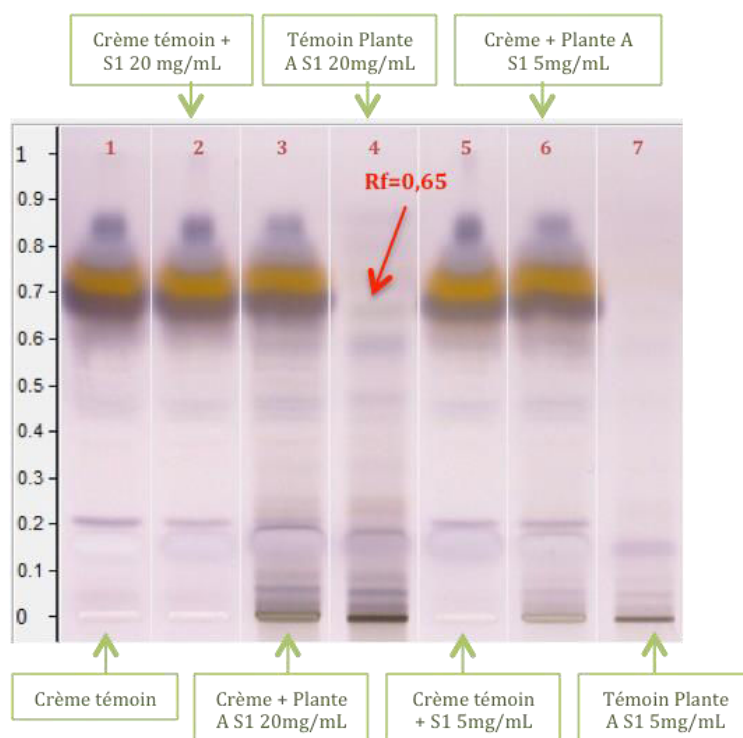


Figure 37 : plaque HPTLC observée en lumière blanche après révélation à l'anisaldéhyde d'échantillons (1) de crème témoin diluée par 10 (dépôt 20 $\mu$ L), (2) de crème témoin diluée par 10 contenant le support S1 à 20mg/mL (dépôt 20 $\mu$ L), (3) de crème contenant l'extrait de plante A sur support S1 diluée par 10 (dépôt 20 $\mu$ L), (4) de l'extrait de plante A sur support S1 à 2mg/mL (dépôt 2 $\mu$ L), (5) de crème témoin diluée par 10 contenant le support S1 à 5 mg/mL (dépôt 20 $\mu$ L), (6) de crème contenant l'extrait de plante A sur support S1 à 5 mg/mL diluée par 10 (dépôt 20 $\mu$ L) et (7) d'extrait de plante A sur support S1 à 5 mg/mL (dépôt 2 $\mu$ L).

Nous avons alors abaissé les concentrations des matrices cosmétiques (dépôt de 2  $\mu$ L au lieu de 20  $\mu$ L) pour obtenir une meilleure résolution (Figure 38). Seulement, bien que visuellement, nous aurions pu penser que la séparation était bonne, l'analyse des densitogrammes des différents échantillons de la plaque à 420 nm (bonne longueur d'onde d'absorbance de la couleur verte observée) montrent qu'il y a une superposition entre l'actif et des composés de la matrice cosmétique à 0,65 (Figure 39). Cette méthode n'est donc pas adaptée à la quantification de l'actif dans les produits cosmétiques. De plus nous pouvons ajouter que pour réaliser un dosage optimal par HPTLC, il est préférable que l'actif à doser ait un Rf situé entre 0,3 et 0,5 [216]. Nous avons alors modifié les proportions des solvants de la phase mobile afin d'en réduire la force éluante et ainsi isoler l'actif des composés gras de la matrice cosmétique.

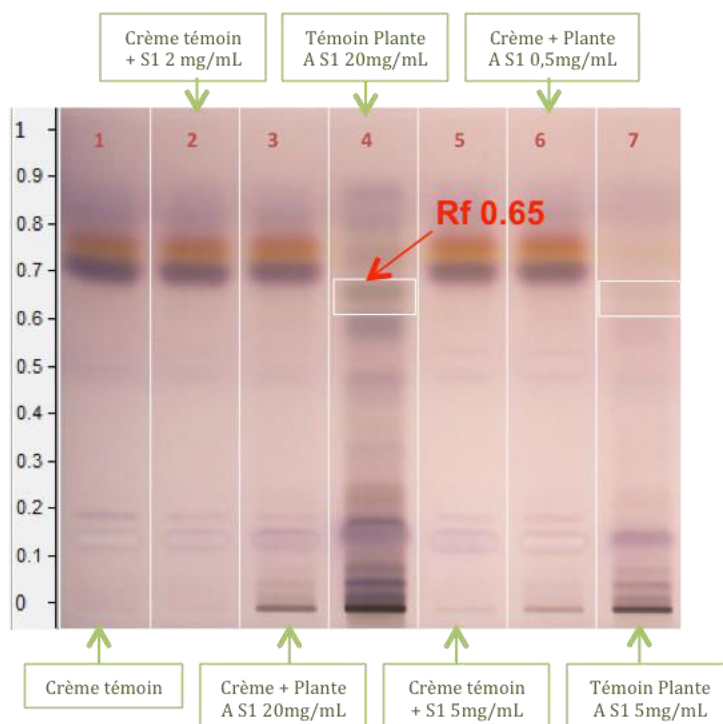


Figure 38 : plaque HPTLC observée en lumière blanche après révélation à l'anisaldéhyde d'échantillons (1) de crème témoin diluée par 10 (dépôt 2  $\mu$ L), (2) de crème témoin diluée par 10 contenant le support S1 à 20 mg/mL (dépôt 2  $\mu$ L), (3) de crème contenant l'extrait de plante A sur support S1 diluée par 10 (dépôt 2  $\mu$ L), (4) de l'extrait de plante A sur support S1 à 20 mg/mL (dépôt 2  $\mu$ L), (5) de crème témoin diluée par 10 contenant le support S1 à 5 mg/mL (dépôt 2  $\mu$ L), (6) de crème contenant l'extrait de plante A sur support S1 à 5 mg/mL diluée par 10 (dépôt 2  $\mu$ L) et (7) d'extrait de plante A sur support S1 à 5 mg/mL (dépôt 2  $\mu$ L).

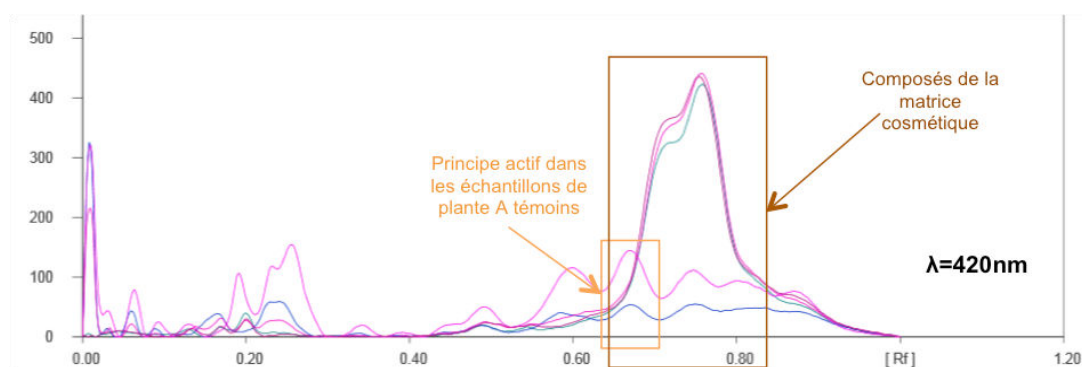
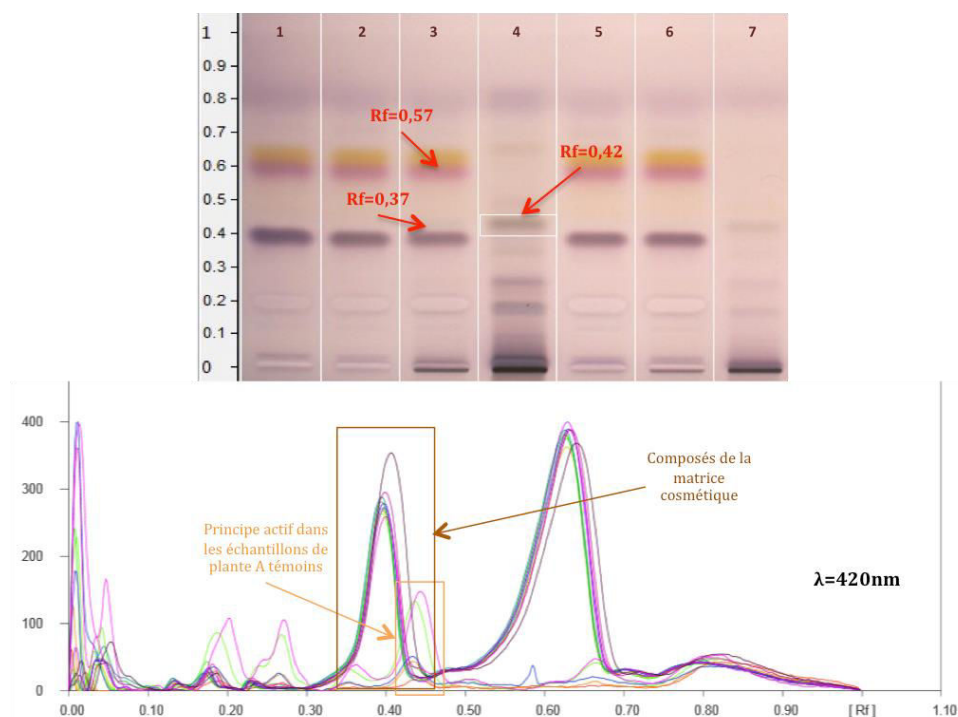


Figure 39 : densitogramme des échantillons de la plaque (Figure 38) à 420 nm. Mise en évidence de la superposition de l'actif recherché avec des composés de la matrice cosmétique.

Nous avons donc modifié la composition des solvants de développement toluène/acétate d'éthyle/acide formique de 70 : 30 : 1 à 96 : 4 : 1 v/v/v. Cette modification abaisse la polarité du mélange.

Cette première modification de la composition des solvants de développement a effectivement permis de modifier la séparation des différents composés. Nous observons (Figure 40) que le principe actif est plus retenu et que le nouveau rapport frontal est de 0,42. Les composés de la matrice cosmétique éluent également différemment. Seulement, le densitogramme réalisé à 420 nm nous montre que nous avons de nouveau

une co-élution avec superposition partielle de l'actif et d'au moins un composé de la matrice cosmétique.



**Figure 40 :** en haut – plaque HPTLC représentant les mêmes échantillons que Figure 38 développée avec un mélange toluène/acétate d'éthyle/acide formique 96 :4 :1 v/v/v. Rf du principe actif de la plante A = 0,42. En bas – densitogrammes des échantillons de la plaque à 420nm. Superposition partielle de l'actif avec au moins un composé de la matrice cosmétique.

Dans une dernière phase d'optimisation de la méthode, deux changements ont été apportés. Nous avons modifié les proportions en solvants de développement à 98 : 2 : 1 en toluène/acétate d'éthyle/acide formique et avons réalisé le densitogramme du principe actif sans révélation à l'anisaldéhyde. En effet, connaissant le profil UV de l'extrait de la plante par HPLC-UV, nous savions qu'il présente une très bonne absorbance vers 310 nm et avons donc envisagé de rechercher une longueur d'onde à laquelle l'actif présenterait une bonne absorbance alors que les composés de la matrice cosmétique ayant des rapports frontaux proche absorberaient faiblement.

Suivant cette dernière méthode, l'actif présente un rapport frontal de 0,42. Nous avons donc réalisé son profil UV et avons noté un maximum d'absorbance à 315 nm (Figure 41). Le densitogramme de la plaque à 315 nm nous a alors permis de mettre en évidence une très bonne séparation de l'actif et des composés de la matrice cosmétique. Nous notons l'absence de composés absorbant à cette longueur d'onde dans l'échantillon témoin de crème à 0,42 et l'apparition de l'actif dans la crème contenant l'extrait. Cette méthode est donc spécifique et nous pouvons dès lors envisager le dosage de l'actif dans les produits cosmétiques.

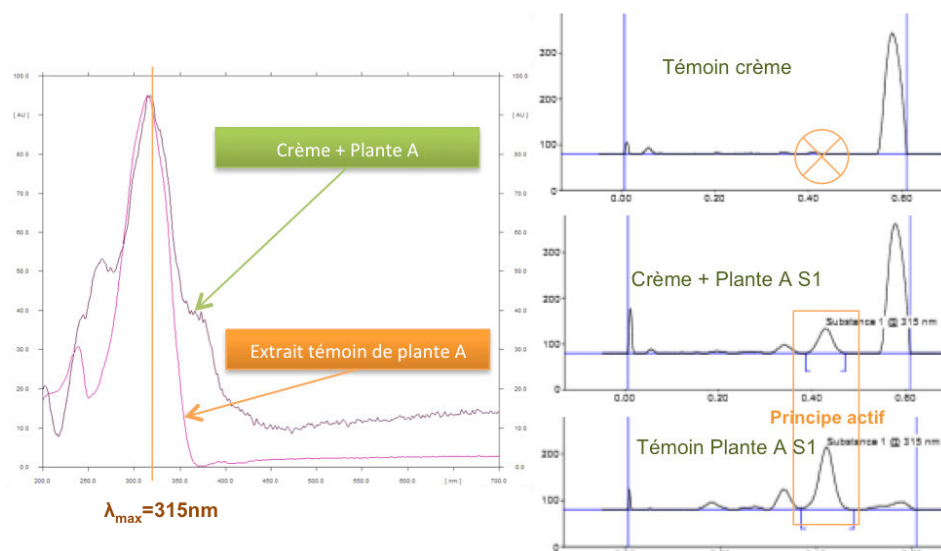


Figure 41 : à gauche – Profils UV de l’actif dans un échantillon de crème (contenant l’extrait) et d’extraits de plante A. L’actif présente un maximum d’absorption à 315 nm. A droite – Profils d’absorbance à 315 nm (en haut) d’un échantillon témoin de crème sans plante A pour lequel aucun signal n’est détecté à 0,42, Rf de l’actif ; (au milieu) d’un échantillon de crème contenant l’extrait de plante A et dans lequel l’actif est détecté à 0,42 ; (en bas) d’un échantillon témoin d’extrait de plante A pour lequel l’actif est bien identifié à 0,42.

### 3.2 Dosage de l’actif

Nous avons réalisé les courbes d’étalonnages à partir des extraits incorporés et dosés dans les différentes crèmes formulées. Ainsi, la courbe d’étalonnage de l’extrait de plante A sur support S1 a permis de doser l’actif dans les crèmes contenant ce même extrait et ainsi avec les 3 supports différents.

Nous avons pu doser l’évolution de la concentration de l’actif dans la crème contenant l’extrait sur support S1 à partir des premiers jours de formulation et sur une durée de 3 mois à température ambiante et 1 mois à 42°C.

Le premier dosage a été effectué 9 jours après formulation. Dans les crèmes contenant 2 % et 0,5 % d’extrait sur support S1, nous avons alors constaté que la totalité de l’actif initialement incorporé était encore présente (Figure 42 (a) et (b)).

Des dosages ont ensuite été effectués à 4 semaines – date correspondant à la mi-parcours des challenges tests (J14) – ainsi qu’à 6 semaines (fin des challenges tests) et enfin à 8 et 13 semaines. Les résultats sont résumés Figure 42. A 6 et 8 semaines, les dosages ont été réalisés sur l’ensemble des crèmes cosmétiques contenant les extraits de plante A sur les 3 supports.

Dans l’ensemble et à la vue des erreurs sur les mesures, nous pouvons conclure à une bonne stabilité de l’actif après 3 mois de conservation à température ambiante.

Les deux échantillons entreposés à l’étuve à partir de 8 semaines et sur une durée de 5 semaines montrent une chute de la concentration en actif. En effet, la concentration est quasiment divisée par 2 dans les deux cas. Il se pourrait que l’actif soit sensible à la chaleur. Il serait donc nécessaire, dans la suite des essais, de vérifier la stabilité de l’actif



à différentes température dans l'extrait brut ainsi que dans des formules cosmétiques. Cette étude permettrait de définir des conditions de stockage appropriées.

Les étapes suivantes sont également de poursuivre les suivis de stabilité à température ambiante, à 42 °C, mais également en entreposant les produits dans des enceintes faisant varier la température. Il serait également intéressant de réaliser des dosages sur ces produits testés par un panel de consommateurs dans des conditions classiques d'utilisation.

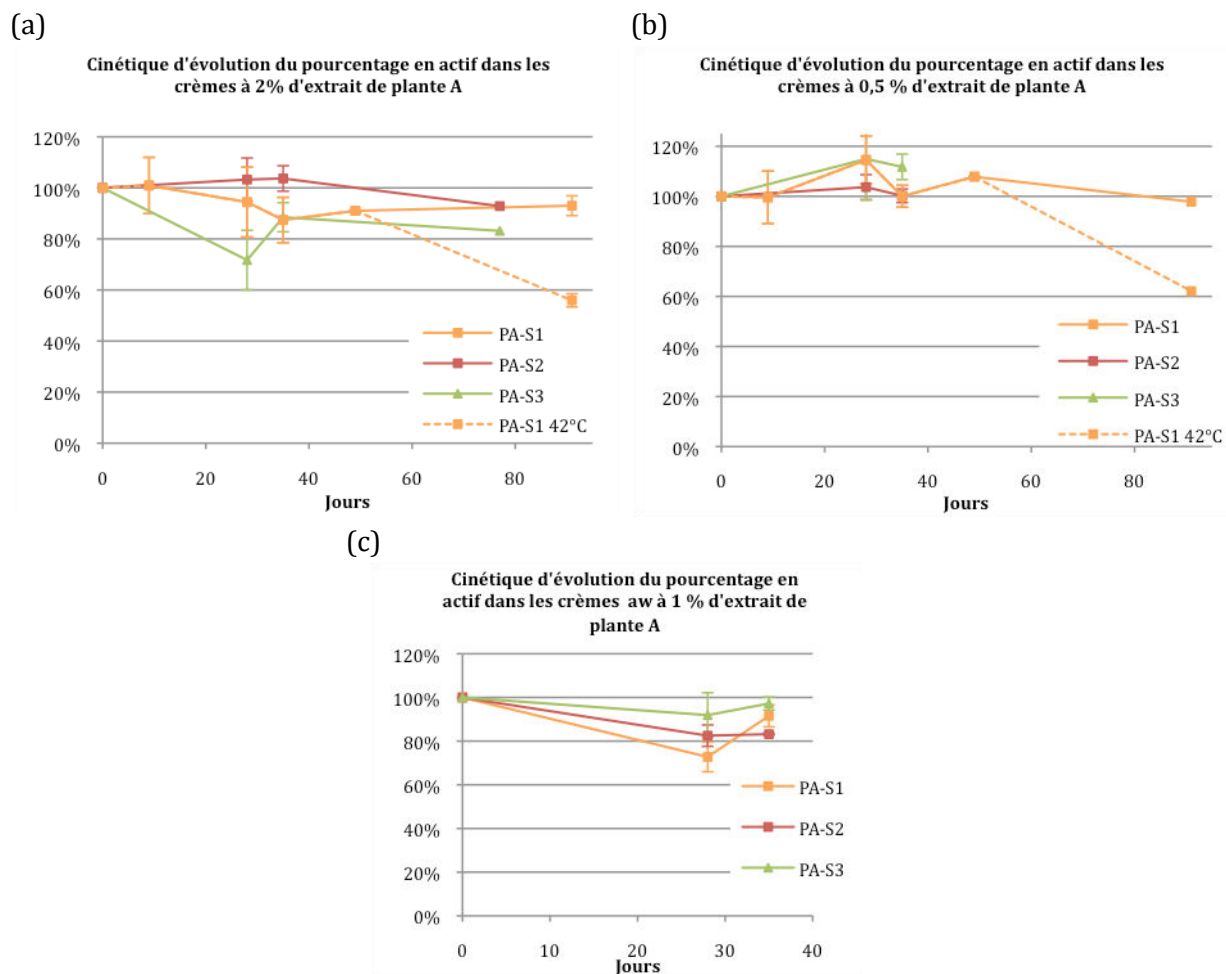


Figure 42 : évolution du pourcentage de l'actif de plante A dans les crèmes par rapport à la quantité théorique incorporée ( $T_{amb}$ ). A 49 jours, des échantillons des essais contenant l'extrait sur support S1 à 0,5 et 2 % sont entreposés à l'étuve à 42°C.

### 3.3 Conclusion

Ainsi, nous avons pu développer une méthode de dosage d'un actif naturel incorporé dans un produit cosmétique complexe par HPTLC. Cette méthode est rapide et présente une bonne solution pour évaluer la qualité d'un produit ainsi que sa stabilité dans le temps. Les dosages réalisés nous permettent de valider la bonne stabilité de l'actif de la plante A incorporé dans une crème conservée à température ambiante pendant les trois mois de suivi. Nous observons néanmoins une dégradation de l'actif après 5 semaines de conservation des produits à 42 °C.



## PARTIE III : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les résultats obtenus dans cette première partie ont montré que l'activité de l'eau est un facteur qui permet d'augmenter la résistance des cosmétiques aux développements microbiens.

Différents extraits de plantes ont révélés un potentiel antibactérien et/ou antifongique élevé, dont la plante A particulièrement étudiée au cours de nos travaux. Les essais de décoloration et la recherche d'un support idéal ont montré qu'il relève du challenge que de trouver l'ingrédient universel. Néanmoins, nous avons pu définir que les deux techniques de décoloration testées permettaient de conserver l'actif principalement responsable de l'activité dans l'extrait. Alors que la distillation moléculaire oblige à utiliser un support hydrophobe pour l'extrait final, réduisant alors son utilisation pour la cosmétique, la décoloration au charbon actif offre plus de liberté. Les tests d'activité antimicrobiens de ces extraits décolorés restent encore à valider sur des extraits méthanoliques.

Les tests antimicrobiens ainsi que les challenges tests réalisés sur des crèmes huile/eau ont montré que 3 essais s'avéraient des plus prometteurs.

L'extrait de plante A sur support caprylyl glycol incorporé à 2 % dans la crème hydratante a répondu aux critères A de la Pharmacopée Européenne pour les challenges tests. L'extrait sur support caprylyl glycol/éthylhexylglycérine à même concentration a montré les mêmes résultats sauf sur *A. brasiliensis* (critères B). Enfin, l'extrait sur support éthylhexylglycérine s'est avéré très prometteur incorporé à 1 % dans la crème optimisée, répondant aux critères A sur toutes les souches, sauf sur *A. brasiliensis* (critères B).

Bien qu'il reste de nombreuses étapes à franchir avant de valider un produit commercialisable (impact de la décoloration sur l'activité, élargissement à une plus large gamme de cosmétiques, définition des concentrations minimales d'inhibition, calcul du coût de fabrication), ces premiers résultats sont des plus encourageants.



## CHAPITRE III

# RESULTATS ET DISCUSSION

## ENCAPSULATION



## INTRODUCTION

La conception d'un système d'encapsulation et de libération d'actif nécessite la connaissance des propriétés physico-chimiques de la matière à protéger, du système d'encapsulation et de leurs comportements respectifs et associés en produits finis cosmétiques. Ces données permettront de faire les bons choix et d'optimiser le développement. Parmi les critères à définir concernant les actifs, nous pouvons citer leur solubilité, stabilité chimique et physique, forme chimique (acide, base, sel...), forme physique (liquide, solide) et caractère hydrophile/hydrophobe [ccxvii].

L'objectif final de notre étude est l'encapsulation d'au moins un extrait de plante aux propriétés antimicrobiennes, voire antioxydantes. Les contraintes concernant ce type d'actifs sont multiples.

Les extraits sont des mélanges complexes de centaines de molécules de tailles et propriétés physico-chimiques différentes. Le système d'encapsulation devra donc permettre l'encapsulation simultanée de molécules aux propriétés variées (notamment lipophiles et hydrophiles).

L'objectif de l'encapsulation de l'extrait est de protéger partiellement le ou les actifs responsable(s) de l'activité biologique recherchée, afin d'en ralentir la consommation ou dégradation dans le produit fini. En effet, une libération retardée devrait permettre de prolonger la conservation du produit fini dans le temps par préservation de la biodisponibilité de l'actif tout en le protégeant d'éventuelles interactions avec d'autres éléments du milieu formulé. Le système d'encapsulation devra donc permettre une fuite des actifs dans le produit fini par diffusion ou destruction graduelle de la membrane de protection.

Dans l'optique de développer un ingrédient conservateur naturel, le procédé d'encapsulation ne doit pas nécessiter l'utilisation de polymères de synthèse ni de solvants organiques car l'entreprise devant fabriquer le système par la suite n'est pas équipée pour l'évaporation de solvants. De plus, en développant un système de conservation naturel, il semble logique que le système d'encapsulation soit naturel.

Enfin, la technologie choisie ne doit pas nécessiter d'investissement coûteux dans du matériel de spécialité pour la formation des capsules à l'échelle industrielle.

A partir des recherches bibliographiques réalisées, et tout en tenant compte des éléments précédemment exposés, nous avons sélectionné des procédés susceptibles de répondre à notre problématique. Comme le montre le Tableau 44, cinq procédés se distinguent :

- La gélotion ionotropique
- La coacervation simple/complexé
- Les émulsions multiples
- Les vésicules multilamellaires type oignons

Une pré-étude de ces quatre procédés d'encapsulation a été menée dans l'objectif d'en choisir un susceptible d'être développé et optimisé pour nos actifs. C'est ce que nous allons exposer dans la section suivante.

Tableau 44 : analyse des différentes techniques d'encapsulation en fonction de nos objectifs et contraintes dans la réalisation des travaux.

| Procédés                 | Technique  | Avantages  | Inconvénients   | Technique concevable | Références |
|--------------------------|--|--|---|----------------------|------------|
| Mécaniques               | <b>Séchage par atomisation (spray drying)</b>              | Aisément formulable avec des polymères naturels (gommes d'acacia, maltodextrines, agar, chitosan...)   | Nécessite un <b>équipement</b> spécifique : tour d'atomisation  | Non                  | [115]      |
|                          | <b>Gélification/congélation de gouttes (spray cooling)</b> | Absence de solvant   | Nécessite un <b>équipement</b> spécifique<br><b>Températures</b> de procédés pouvant affecter les actifs  | Non                  |            |
|                          | <b>Enrobage en lit d'air fluidisé</b>                      | Absence de réaction chimique   | Nécessite un <b>équipement</b> spécifique   | Non                  |            |
|                          | <b>Extrusion</b>   | Possibilité d'utiliser des polymères naturels (alginates)  | Nécessite un <b>équipement</b> spécifique<br>Utilisation de <b>solvants organiques</b><br>Haut degré de <b>stabilité</b> des capsules en milieu formulé | Non                  | [115]      |
|                          | <b>Rapid Expansion of Supercritical Solutions (RESS)</b>   | <b>Absence de solvants organiques</b> et de tensioactifs   | Limité aux <b>actifs hydrophobes</b><br>Nécessite un <b>équipement</b> spécifique   | Non                  |            |
|                          | <b>Aerosol Solvent extraction System (ASES)</b>            |  | Nécessite un <b>équipement</b> spécifique<br>Utilisation de <b>solvants organiques</b>  | Non                  |            |
| <b>Chimiques</b>         | <b>Polymérisation/polycondensation interfaciale</b>        | Possibilité de faire varier la porosité de la membrane polymérique   | Monomères ou polymères synthétiques ou hémi-synthétiques<br>Utilisation de <b>solvants organiques</b>   | Non                  | [ccxviii]  |
| <b>Physico-chimiques</b> | <b>Evaporation/extraction de solvant</b>                   | Encapsulation de petites molécules<br>Possibilité de <b>contrôle de la cinétique de relargage</b><br>Utilisation de <b>polymères biodégradables</b> et <b>biocompatibles</b> | Utilisation de <b>solvants organiques</b>   | Non                  |            |

| Procédés | Technique                                      | Avantages  | Inconvénients   | Technique concevable  | Références |
|----------|--|--|---|---|------------|
|          | <b>Gélation ionotropique</b>                   | Mise à l'échelle du laboratoire aisée  | <b>Porosité</b> élevée d'où une fuite rapide des actifs   | <b>Oui</b>  |            |
|          | <b>Coacervation simple ou complexe</b>         | <b>Hauts rendements</b> d'encapsulation<br>Conditions douces ( <b>absence de solvants organiques</b> et température ambiante)  | Utilisation classique de polymère <b>d'origine animale</b> (gélatine)<br><b>Agents réticulant classiques toxiques</b> : glutaraldéhyde ou formaldéhyde<br>Formation typique de <b>capsules visibles</b> | <b>Oui avec des polymères d'origine naturelle, sans agent réticulant toxique et selon un procédé générant de petites capsules</b> |            |
|          | <b>Emulsions doubles/multiples</b>             | Absence de solvants organiques   | Applications limitées aux produits dispersés  | <b>Oui</b>  |            |
|          | <b>Liposomes</b>                               | Encapsulation simultanée d'actifs hydrophiles et hydrophobes<br>Perméabilité du système et fuite des actifs par diffusion à travers les membranes ou destruction graduelle des bicouches lipidiques                          | Utilisation de <b>solvants organiques</b><br>Faible rendements d'encapsulation des actifs<br>Incompatibilité avec certains tensioactifs   | Non   |            |
|          | <b>Vésicules multilamellaires type oignons</b> | Encapsulation simultanée d'actifs hydrophiles et hydrophobes avec de hauts rendements<br>Perméabilité du système et fuite des actifs par diffusion à travers les membranes ou destruction graduelle des bicouches lipidiques | Incompatibilité avec certains tensioactifs  | <b>Oui</b>  |            |



## **PARTIE I : DEVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UN SYSTEME D'ENCAPSULATION**

### **1. VALIDATION D'UN SYSTEME D'ENCAPSULATION**

Nous avons étudié plus attentivement les quatre systèmes pré-sélectionnés et avons, pour certains, réalisé des pré-tests afin de définir le système qui constituerait la base de notre étude.

#### **1.1 Emulsions multiples**

Les émulsions multiples sont une voie de choix, permettant l'encapsulation d'actifs hydrophiles et hydrophobes par partage dans les phases aqueuses et huileuses émulsionnées. La difficulté de l'encapsulation par les émulsions multiples (ex :  $E_1/H/E_2$ ) réside principalement dans la maîtrise des paramètres influençant leur stabilité :

- Les effets osmotique et de Laplace (différence de pression) entre les gouttelettes d'eau de la phase  $E_1/H$  et les deux phases aqueuses  $E_1$  et  $E_2$  ;
- Les interactions entre les émulsifiants de faibles et hautes HLB à l'interface  $H/E_2$  ;
- L'influence des interactions entre le viscosifiant introduit dans la phase aqueuse externe  $E_2$  et l'émulsifiant hydrophile.

Dans le cadre de notre étude, une contrainte supplémentaire est la nécessité d'un système d'encapsulation naturel. Or, les émulsions multiples sont majoritairement fabriquées à partir de tensioactifs de synthèse, et/ou d'huiles minérales ou de paraffine et/ou de polymères de synthèse [219].

Etant données ces contraintes ainsi que celle liée au temps, nous n'avons pas sélectionné cette technique. Celle-ci demeure néanmoins un procédé de choix qui nous paraît approprié à nos exigences et demeure donc prometteuse.

#### **1.2 Gélation ionotropique**

Des essais préliminaires ont été réalisés par gélation ionotropique afin de mieux évaluer les problématiques en jeu pour l'optimisation d'un système d'encapsulation répondant à nos objectifs.

##### *1.2.1 Démarche 1*

La première série d'essais a été réalisée par réticulation directe d'une solution d'alginate dans un bain de chlorure de sodium  $\text{CaCl}_2$  (1 % massique). Dans cette étape de faisabilité, nous n'avons pas tenu compte de la taille des capsules et avons formulé des millicapsules de diamètre moyen  $2,1 \pm 0,1$  mm. Deux grades d'alginate à fort potentiel réticulant, se distinguant par leur potentiel viscosifiant ont été comparés à 1 % massique dans l'eau. Un extrait végétal commercial hydro-alcoolique d'*Hypericum*

*perforatum* L. (Millepertuis commun, Naturex) a été incorporé à 0,5 % (massique) dans ces solutions pour encapsulation.

Nous observons alors un relargage de l'extrait dans les minutes qui suivent la formation des capsules. La porosité est donc trop importante. De plus, nous notons un phénomène de réticulation trop prononcé car les billes formées sont dures et ne se détruisent pas facilement. Ce phénomène est dû à la diffusion des ions calcium  $\text{Ca}^{2+}$  à l'intérieur des sphères.

Les capsules ayant été conservées quelques jours, nous avons observé que les billes formées devaient être maintenues en milieu humide afin d'empêcher leur dessèchement.

Pour remédier à ces problèmes, des solutions ont été testées dans le cadre d'une deuxième démarche.

### 1.2.2 Démarche 2

Afin de remédier au problème de la porosité, il est possible d'ajouter au système un agent réticulant tel que du chitosan ou une gomme de xanthane.

Pour palier au problème de la réticulation, nous avons choisi de faire varier les concentrations en alginate (0,5 – 2 % massique), en  $\text{CaCl}_2$  (1 – 10 % massique) et avons procédé par réticulation indirecte (incorporation de gouttes de  $\text{CaCl}_2$  dans un bain d'alginate et non l'inverse).

Les essais ont montré que les solutions salines ne présentaient pas une densité suffisante pour être incorporées simplement dans le bain d'alginate et former les billes. Nous avons alors ajouté une gomme de xanthane (0,3 - 0,5 % massique) dans la solution de  $\text{CaCl}_2$  afin d'en augmenter la densité.

Avec 0,5 % (massique) de gomme de xanthane dans du  $\text{CaCl}_2$  (10 % massique), nous avons pu former des billes dans le bain d'alginate. En retirant rapidement les billes du bain, nous avons pu obtenir des billes constituées d'une paroi fine et d'un cœur liquide, s'ouvrant facilement sous la simple pression du doigt contre la peau.

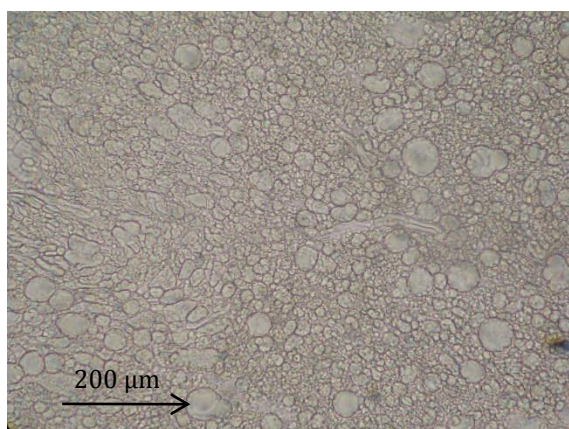
### 1.2.3 Conclusion et perspectives

Cette technique n'a pas été retenue pour une étude plus poussée car d'autres études plus prometteuses ont été développées en parallèle (voir ci-dessous). Toutefois, dans l'optique d'une étude plus poussée, il aurait fallu travailler sur l'ajout d'un agent réticulant pour limiter la porosité, et donc la fuite des extraits, ainsi que sur la réduction de la taille des billes par modification du procédé. On pourrait envisager, par exemple, l'émulsification de l'une des phases aqueuses (alginate ou  $\text{CaCl}_2$ ) dans une phase grasse et ajout de la phase aqueuse complémentaire pour la formation de microgouttelettes réticulées. Néanmoins, les données bibliographiques montrent que ces techniques d'émulsification génèrent des capsules d'une granulométrie de plusieurs dizaines ou centaines de micromètres, taille qui est trop importante pour notre projet [144,220].

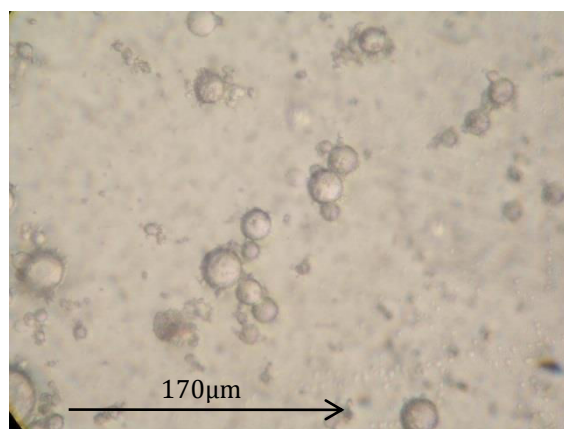
### 1.3 Coarcervation complexe : Gomme arabique/lécithines

Bien que les capsules formées par coarcervation complexe soient classiquement formées par l'association de la gélatine (polycation) et d'un colloïde chargé négativement, telle que de la gomme arabique réticulée avec du formaldéhyde ou du glutaraldéhyde, nous avons souhaité faire des essais de faisabilité sur des systèmes ne comportant ni de gélatine (produit d'origine animale dont l'utilisation en cosmétique tend à disparaître), ni d'agents réticulants synthétiques d'utilisation controversée en cosmétique. Nous avons donc testé l'association d'une gomme arabique et de lécithines pour la formation de la paroi des capsules [158]. Le protocole détaillé est décrit chapitre IV, p. 203. Brièvement, 50 mL d'une solution aqueuse de gomme arabique (7,5 % m/m) ont été ajoutée à 40 mL d'une solution de lécithine (9,4 % m/m) ajustée à pH 8 (hydroxyde de sodium) contenant 1,25 à 2,50 % m/m d'actif hydrophobe émulsionné à l'aide d'un moteur équipé d'une hélice défloculeuse (huile de noyau d'abricot ou huile essentielle de cannelle). L'ensemble a ensuite été acidifié à pH 4 avec de l'acide citrique, la réaction de coarcervation étant poursuivie 30 min à 50°C. Alors que tous les essais réalisés à l'aide d'une lécithine de soja non purifiée ont conduit à des observations macroscopiques et microscopiques d'agrégats ou d'amas informes nous paraissant inintéressants, le système formulé avec une lécithine purifiée en phosphatidylcholine (Emulmetik 930) encapsulant une huile essentielle de cannelle a permis la formation de capsules de tailles hétérogènes et agrégées mais prometteuses (Figure 43). La dispersion des capsules précipitées et agglomérées dans de l'huile de vaseline permet d'observer de belles capsules sphériques, les plus petites étant agrégées en surface des plus grosses.

a)



b)



**Figure 43 : photos au microscope optique des capsules formées par coarcervation complexe à base de gomme arabique, de lécithine purifiée et d'huile essentielle de cannelle a) X100 observation du concentré précipité et b) X40 dispersion du concentré à 10 % dans de l'huile de vaseline.**

Ainsi, ces premiers essais de formulation de capsules par coarcervation complexe sont positifs quant à cette première caractérisation au microscope optique. Cette voie pourrait donc être retenue pour nos travaux, tout en gardant à l'esprit que notre problématique visant à encapsuler des actifs hydrophiles et hydrophobes oblige à une

adaptation du système. En effet, les polymères encapsulent ici une huile essentielle (hydrophobe). Pour remédier à cela, il faudrait donc penser à une étape d'émulsification des actifs polaires dans une matrice apolaire à encapsuler.

#### 1.4 Vésicules multilamellaires : oignons

Les vésicules multilamellaires de type oignon, à base de phospholipides, étant fabriquées sans solvant organique et permettant l'encapsulation d'actifs hydrophiles et hydrophobes avec de hauts rendements d'encapsulation, nous ont paru un système de choix, remplissant nos objectifs [175,221,222,223]. Nous avons réalisé des essais de faisabilité à partir de deux grades de lécithines riches en phosphatidylcholine et contenant un minimum de lysophosphatidylcholine, conditions nécessaires pour la formation des oignons (Tableau 45).

Tableau 45 : composition des phospholipides sélectionnés

| Phospholipides                     | Phospholipon 85G     | Emulmetik 930        |
|------------------------------------|----------------------|----------------------|
| Fournisseurs                       | Cosmetochem (Lipoid) | Unipex (Lucas Meyer) |
| % Phosphatidylcholine (PC)         | 89,5                 | 95,4                 |
| % Lysophosphatidylcholine (LysoPC) | 2,7                  | <1                   |

La structure des phosphatidylcholines est représentée Figure 44.

Figure 44 : structure des phosphatidylcholines. R1 et R2 : chaînes aliphatiques insaturées.

En se basant sur des travaux précédents [176,180,182,224], nous avons formulé un système contenant 55 % (en masse) de phospholipides et 45 % de phase aqueuse. Pour ces essais, nous avons simplement utilisé de l'eau pour la phase aqueuse. La formation des oignons est réalisée grâce à plusieurs étapes de cisaillement du mélange alternées par des phases de centrifugation. Le système obtenu est un concentré de vésicules, qui une fois dispersées dans l'eau, forment les vésicules multilamellaires concentriques souhaitées : les oignons.

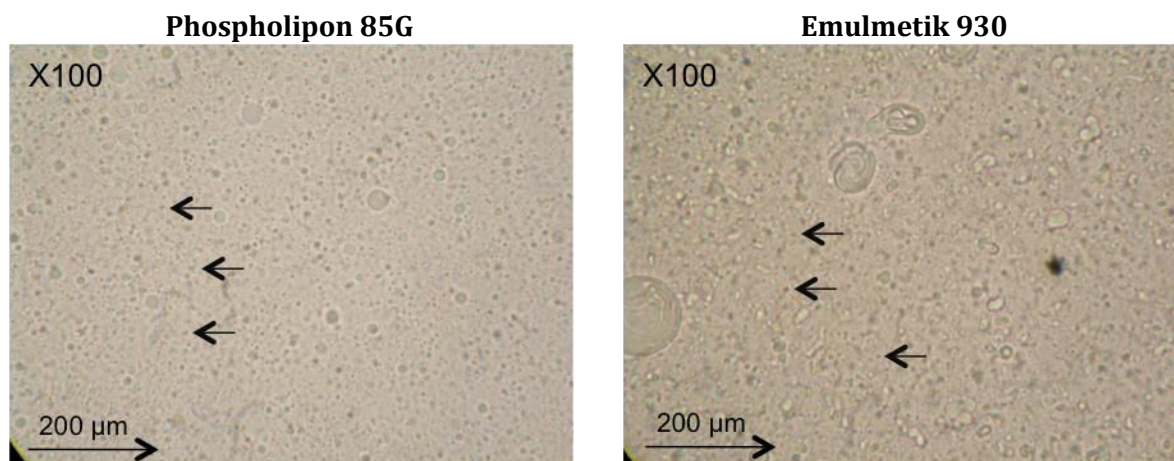


Figure 45 : observation au microscope optique, grossissement X100, des dispersions d'oignons contenant 55 % massique de phospholipides et 45 % massique d'eau. A gauche : formulation à base de Phospholipon 85G. A droite : formulation à base d'Emulmetik 930. Les flèches indiquent de petites vésicules sombres, contenant donc de nombreuses bicouches, signature des oignons.

Comme le montrent les observations au microscope optique des dispersions de vésicules obtenues à partir des deux grades de phospholipides, le phospholipon 85G permet la formation de vésicules plus petites, homogènes et concentriques (plus les vésicules observées sont sombres, plus le nombre de bicouches est important) que l'Emulmetik 930. Ce dernier génère la formation de vésicules hétérogènes, avec notamment de grosses vésicules multilamellaires, démontrant par là que la composition du système n'est pas optimale. En effet, ce phénomène est synonyme d'un gonflement des bicouches lors de la réalisation de la dispersion des oignons dans l'eau. Ceci peut s'expliquer par un manque d'eau dans les bicouches lamellaires (45 %) pour atteindre leur gonflement maximal.

La formation de capsules de petite taille, homogènes et très majoritairement structurées en oignons, à partir du phospholipon 85G nous a semblé un excellent choix pour poursuivre nos essais. La possibilité d'encapsuler tout autant une phase hydrophile qu'hydrophobe à l'aide de ce système entre en parfaite adéquation avec notre problématique. De plus, le procédé de formulation des capsules est simple et rapide à mettre en œuvre. Enfin, l'utilisation des phospholipides de soja, produits naturels, s'accorde avec le projet d'encapsuler et vectoriser un extrait naturel.

## 1.5 Conclusion

**Au regard de ces essais de faisabilité, les contraintes observées et résultats obtenus nous ont incité à choisir de développer l'encapsulation d'extraits végétaux dans le système lipidique multilamellaire que sont les oignons.**

## 2. DEVELOPPEMENT DU SYSTEME D'ENCAPSULATION RETENU : VESICULES MULTILAMELLAIRES TYPE OIGNONS

Les extraits végétaux sont des mélanges de centaines de molécules de propriétés physico-chimiques différentes. Or, lors du développement et de l'optimisation d'un système d'encapsulation, il est nécessaire de connaître une ou plusieurs molécules d'intérêt(s) de l'extrait et d'être capable de les doser afin de pouvoir évaluer l'efficacité du système à les retenir. Ainsi, nous avons fait le choix de démarrer l'optimisation du système d'encapsulation à partir d'analytes modèles

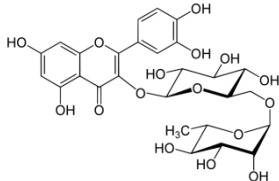
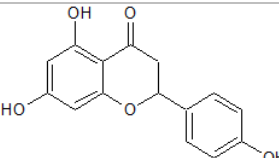
### 2.1 Choix des analytes

Les analytes choisis pour développer le modèle sont la rutine et la naringénine. Ils nous ont paru adéquats car ce sont deux flavonoïdes très présents dans le monde végétal et connus pour leurs propriétés antimicrobiennes et antioxydantes [225,226,227,228].

De plus, ce choix nous a permis d'évaluer le système sur deux molécules de propriété, taille, structure et polarité différentes (Tableau 46).

Ces actifs sont aisément séparés et dosés par HPLC-UV à 258 nm pour la Rutine et 290 nm pour la Naringénine (Figure 46). Nous observons sur le profil à 290 nm que la Rutine y absorbe fortement, mais pas autant qu'à 258 nm.

Tableau 46 : caractéristiques de la rutine et la naringénine

| Composés           | Structure   | M (g/mol) | Solubilité dans l'eau (mg/L) | Réf   |
|--------------------|---|-----------|------------------------------|-------|
| <b>Rutine</b>      |  | 610,52    | 45                           | [229] |
| <b>Naringénine</b> |  | 272,25    | 0,35.10 <sup>-3</sup>        | [230] |

Afin d'étudier l'encapsulation des actifs choisis dans les oignons, plusieurs étapes ont été établies et suivies systématiquement.

La formation des oignons a tout d'abord été validée par microscopie optique. Le diamètre moyen des particules ainsi que le profil de répartition des tailles (polydispersité) ont ensuite été mesurés par diffraction laser. Puis une méthode de dosage des actifs non encapsulés a été optimisée par HPLC-UV-DAD. Enfin, plusieurs méthodes de séparation des capsules de leur milieu de dispersion ont été testées :

- La chromatographie d'exclusion SEC
- l'ultracentrifugation

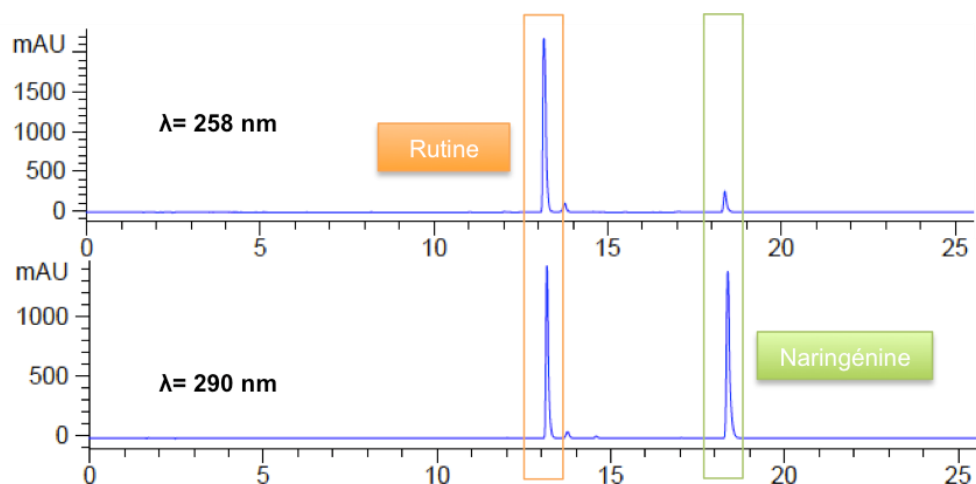


Figure 46 : profils HPLC-UV de la rutine et de la naringénine.

## PARTIE II : DEVELOPPEMENT ET OPTIMISATION DES OIGNONS EN FONCTION DES PHOSPHOLIPIDES

### 1. MATIERES PREMIERES

Comme défini précédemment (p. 137), nous avons choisi de formuler les oignons avec pour base de phospholipides, le Phospholipon 85G. La première étape du développement a été la modification de la nature de la phase aqueuse. Alors que le système est habituellement formulé avec de l'eau comme phase hydrophile, nous avons substituée celle ci par un mélange glycérine/propylène glycol 60 : 40 v/v (nommé mélange G-PG). Ce mélange a été défini en adéquation avec les résultats de solubilité obtenus dans le chapitre II avec l'extrait de plante A (p. 100).

Les essais de substitution de l'eau par le mélange G-PG ont été réalisés sur une composition de lipides/phase hydrophile 55 : 45 (m:m), la phase hydrophile étant constituée de G-PG pur ou contenant de la rutine et de la naringénine à 30 et 8 mg/mL respectivement.

#### 1.1 Microscopie

L'observation au microscope optique (Figure 47) des dispersions de capsules formulées avec le mélange G-PG (sans puis avec actifs) montre la formation de vésicules multilamellaires, nombreuses et homogènes en forme et en taille. Aucune influence notable de l'ajout des actifs dans le G-PG n'est visualisée par microscopie.



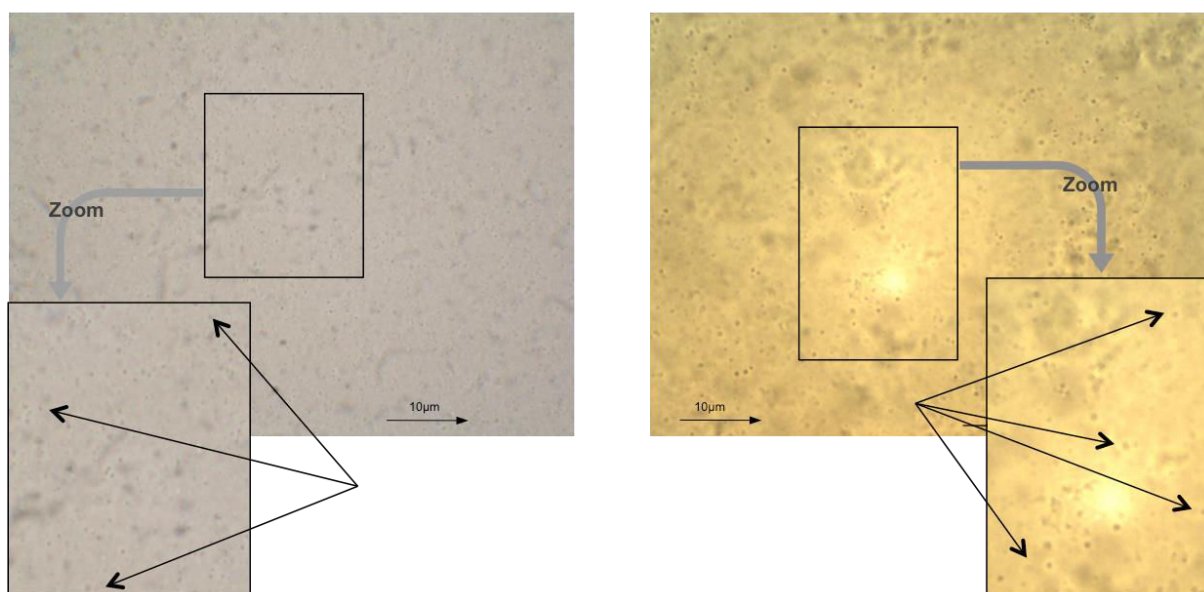


Figure 47 : photo au microscope optique (X100) d'une dispersion de capsules de ratio lipide / G-PG 55 : 45, (à gauche) sans actif, (à droite) avec la rutine et la naringénine solubilisées à 30 et 8 mg/mL respectivement dans la phase G-PG.

## 1.2 Granulométrie

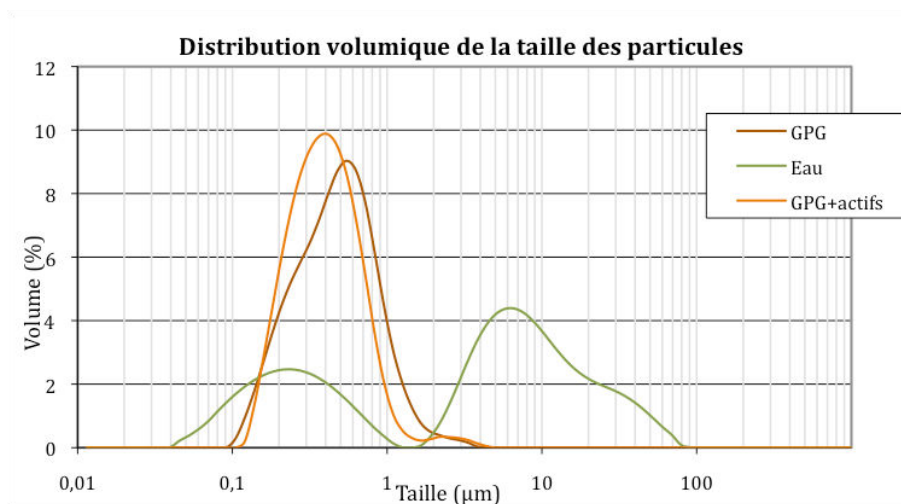


Figure 48 : distribution volumique de la taille des vésicules formulées avec le phospholipon 85G, suivant un ratio lipides/phase aqueuse 55 : 45 (m:m), en fonction de la nature de la phase aqueuse : eau, GPG et GPG + rutine/naringénine à 30 et 8 mg/mL.

Les mesures des tailles des vésicules sont réalisées par diffraction laser. Suivant cette méthode, la distribution granulométrique d'un mélange est déduite de l'interaction entre le mélange de particules et le faisceau laser incident par l'analyse de la tache de diffraction du faisceau. Plus particulièrement, les particules analysées diffractent la lumière incidente du laser selon un angle inversement proportionnel à leur taille. Ainsi, les petites particules diffractent aux grands angles avec une faible intensité alors que les plus grandes diffractent aux petits angles avec une forte intensité. L'appareil mesure



alors l'intensité diffractée à l'aide de détecteurs photosensibles. La technique s'applique aux particules sphériques, dont l'indice de réfraction est connu.

La distribution granulométrique des capsules en fonction de la nature de la phase hydrophile (eau, G-PG et G-PG+actifs) a été mesurée (Figure 48). Nous notons alors que la substitution de l'eau par le G-PG génère une nette modification de la distribution volumique des capsules. Lorsque la phase hydrophile est de l'eau, nous observons une première distribution de taille allant de 40 nm à 1,445  $\mu\text{m}$  avec un pic à 240 nm et une deuxième distribution allant de 1,660  $\mu\text{m}$  à 91,201  $\mu\text{m}$  avec un pic à 6,607  $\mu\text{m}$ .

La distribution de taille lorsque l'eau est substituée par le G-PG est plus fine. Nous n'observons pas d'influence notable lorsque les actifs sont ajoutés. Les oignons contenant les actifs présentent une distribution de taille de particules allant de 120 nm à 4,365  $\mu\text{m}$  avec un pic à 417 nm.

Ces mesures confirment les observations microscopiques.

### 1.3 Nanoparticules et réglementation

Les mesures granulométriques nous ont conduits à nous interroger sur l'utilisation de ces vésicules dont certaines présentent des tailles inférieures à 100 nm, alors définies comme des nano-objets.

Depuis le 11 janvier 2013, les nanomatériaux contenus dans les produits cosmétiques doivent être notifiés à la Commission européenne. En effet, les substances à l'état nanoparticulaire sont très utilisées par différents secteurs (alimentation, aéronautique, cosmétique, énergies alternatives, pneumatique, santé...) pour leurs propriétés particulières et spécifiques. Or, comme l'a souligné le communiqué de la Commission européenne du 3 octobre 2012, une substance peut présenter des profils de danger différents selon qu'elle soit à l'état nanoparticulaire ou non [231]. En effet, lorsque la taille d'une particule diminue, sa réactivité augmente et on peut alors observer une modification des propriétés physiques, biologiques et chimiques. La taille peut donc avoir une incidence sur la sécurité des matériaux [232].

Les nanomatériaux étant encore peu connus, notamment en ce qui concerne les risques qu'ils peuvent présenter, la Commission européenne a voulu établir une définition claire (CE n°2011/696/UE) pour s'assurer que des règles de sécurité chimique appropriées sont appliquées :

« 1 – On entend par « nanomatériau » un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50 % des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm.

2 – Dans des cas spécifiques, lorsque cela se justifie pour des raisons tenant à la protection de l'environnement, à la santé publique, à la sécurité ou à la compétitivité, le seuil de 50 % fixé pour la répartition numérique par taille peut être remplacé par un seuil

compris entre 1 % et 50 %.

3 – Par dérogation au point 2, les fullerènes, les flocons de graphène et les nanotubes de carbone à paroi simple présentant une ou plusieurs dimensions externes inférieures à 1 nm sont à considérer comme des nanomatériaux. »

Il est à considérer que cette définition sera revue en 2014 à la lumière des progrès techniques et scientifiques [233,234].

La réglementation cosmétique définit quant à elle le nanomatériau comme « un matériau insoluble ou bio-persistant, fabriqué intentionnellement et se caractérisant par une ou plusieurs dimensions externes, ou une structure interne, sur une échelle de 1 à 100 nm ».

Au vu de ces définitions, les matériaux solubles et non bio-persistant telles que les structures vésiculaires labiles dont font partie les liposomes et autres structures uni- ou multi-lamellaires sur lesquels se sont portés nos choix de travaux ne sont pas à déclarer comme nanomatériaux [235,236,232].

## 2. RENDEMENTS D'ENCAPSULATION

Afin de calculer les rendements d'encapsulation, il est nécessaire de séparer les actifs non encapsulés des capsules. Différentes méthodes peuvent être envisagées pour y parvenir telles que la dialyse [165], l'ultracentrifugation [237], la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) [238], l'extraction sur phase solide [239]. Nous avons comparé l'ultracentrifugation et la SEC.

### 2.1 Comparaison des méthodes de séparation

#### 2.1.1 Ultracentrifugation – Chromatographie d'exclusion stérique

Dans un premier temps, nous avons préparé des dispersions d'oignons contenant de la rutine et de la naringénine (système phospholipon 85G/(G-PG+actifs) 55 : 45) et avons séparé les actifs libres des actifs encapsulés suivant les deux méthodes.

Par ultracentrifugation, nous avons récupéré le surnageant et l'avons analysé par HPLC-UV (voir protocole de préparation des échantillons chapitre IV, p. 209).

Par SEC, nous avons fractionné l'échantillon de vésicules par dépôt sur phase d'exclusion puis élution avec de l'eau. Nous avons ainsi récupéré dans les premières fractions les vésicules, suivies des actifs non encapsulés, éléments plus petits. La rutine, de masse molaire et de volume plus importants que la naringénine, a été récupérée avant cette dernière. Les fractions contenant les oignons ont été traitées avec un tensioactif non-ionique, le Triton X100, permettant leur destruction pour libérer les actifs piégés. L'ensemble des fractions a été analysé par HPLC-UV. Nous noterons que deux phases d'exclusion ont été comparées, une Sephadex G10 (à base de dextrane – polymère ramifié de dextrose – réticulé avec de l'épichlorohydrine) et une Sephacryl 300HR (à base d'acrylique – copolymère de dextrane et de bisacrylamide). La première, permet la

séparation de molécules de faibles poids moléculaires (100-800 g/mol), la deuxième étant mieux adaptée à des molécules de plus haut poids moléculaire ( $10^4$ - $2.10^6$  g/mol). La Sephadex s'est montrée peu adaptée à nos échantillons. En effet, bien qu'elle ait permis une bonne séparation des capsules et des deux analytes, les volumes d'élution étaient bien trop importants (12-140 mL pour la rutine et 170-350 mL pour la naringénine). La Sephacryl était alors idéale avec de faibles volumes d'élution par comparaison (6-25 mL pour la rutine et 15-40 mL pour la naringénine) tout en permettant une bonne séparation entre les vésicules et les analytes. Suite à ces essais préliminaires de comparaison de phases, tous les essais d'exclusion ont donc été réalisés avec la Sephadex 300HR.

Afin de valider la méthode de séparation par exclusion stérique, les profils d'élution de solutions d'actifs et de dispersions d'oignons contenant l'actif ont été comparés pour voir si un recouvrement pouvait avoir lieu et entraver la séparation vésicules/actifs libres (Tableau 47).

**Tableau 47 : caractérisation du fractionnement des actifs avec et sans oignons, avec la Sephacryl 300HR**

|  | Volume d'élution (mL) | Recouvrement<br>oignons/actif libre | % actif dosé<br>après<br>fractionnement |
|--|-----------------------|-------------------------------------|---|
| Rutine                                 | 6-25                  | Non                                 | 106,0 ± 4,0 %                           |
| Oignons contenant de<br>la Rutine      | 1,5-5,0               |                                     |   |
| Naringénine                            | 15-40                 | Non                                 | 99,1 ± 3,2 %                            |
| Oignons contenant de<br>la Naringénine | 2,0-5,0               |                                     |   |

N'ayant pas observé de recouvrement entre les volumes d'élution des oignons et des actifs libres, la méthode a été validée.

La séparation et récupération des actifs libres et encapsulés nous a permis de déterminer les rendements d'encapsulation des deux actifs (Tableau 48, colonne 1). Le rendement d'encapsulation est le rapport entre les molécules encapsulées et la totalité des molécules introduites, exprimé en pourcentage. Nous remarquons alors une différence significative de résultats entre les deux techniques avec des rendements d'encapsulation supérieurs lorsque la technique appliquée est l'ultracentrifugation. Nous avons alors envisagé deux explications à ces résultats. L'ultracentrifugation étant réalisée à 4 °C et l'exclusion à température ambiante, un phénomène de précipitation des actifs pouvait être envisagé à froid. Nous pouvons noter à ce stade que les concentrations en actifs solubilisés dans le mélange G-PG sont très nettement supérieures aux limites de solubilité dans l'eau (Tableau 46). Donc si les rendements d'encapsulation sont faibles, nous pouvons nous attendre à une précipitation des actifs libres dans la phase aqueuse de dispersion. Ensuite, nous avons également pensé qu'une

partie des actifs libres pouvaient s'adsorber en surface des oignons, ce phénomène pouvant alors être accentué par ultracentrifugation.

Les essais réalisés avec des solutions contenant seulement les actifs, en l'absence de vésicules donc, montrent que l'exclusion permet de récupérer la totalité des actifs (Tableau 48, colonne 2). Par ultracentrifugation, nous observons par contre une très légère précipitation (visible dans le culot du tube). Ceci est confirmé par le dosage, puisque notamment pour la naringénine, la totalité de la molécule n'est pas retrouvée ( $93,7 \pm 6,7\%$ ). Toutefois, cette faible précipitation ne peut expliquer un tel écart de rendements d'encapsulation entre les deux techniques.

Afin de vérifier l'hypothèse de l'adsorption, nous avons préparé des oignons « blancs » (oignons sans actifs, contenant simplement les lipides et le mélange G-PG) que nous avons dispersés dans une solution aqueuse contenant la rutine et la naringénine aux concentrations équivalentes à celles contenues normalement dans les dispersions d'oignons ( $C_{Rut} = 289 \mu\text{g/mL}$  et  $C_{Nar} = 77 \mu\text{g/mL}$ ). Les résultats (Tableau 48, colonne 3) montrent alors une adsorption systématique des actifs en surface des oignons. Mais là encore, les valeurs diffèrent d'une méthode à l'autre. Une raison possible à ces différences est la durée du protocole expérimental. En effet, la séparation par ultracentrifugation dure 5 h, alors que le temps de dispersion appliqué avant séparation par exclusion est d'environ 10 min. Nous avons donc réalisé une cinétique d'adsorption avant séparation par exclusion (Figure 49).

**Tableau 48 : rendements d'encapsulation et d'adsorption de la rutine et la naringénine par ultracentrifugation et chromatographie d'exclusion**

| %                  | Rendements d'encapsulation |                | Témoins (actifs libres) |                 | Rendements d'adsorption |                |
|--------------------|----------------------------|----------------|-------------------------|-----------------|-------------------------|----------------|
|                    | UC*                        | Exclusion      | UC                      | Exclusion       | UC                      | Exclusion      |
| <b>Rutine</b>      | $71,2 \pm 1,0$             | $32,0 \pm 6,6$ | $97,3 \pm 1,6$          | $106,0 \pm 4,0$ | $67,3 \pm 1,1$          | $17,9 \pm 0,6$ |
| <b>Naringénine</b> | $99,6 \pm 0,2$             | $63,1 \pm 8,1$ | $93,7 \pm 6,7$          | $99,1 \pm 3,2$  | $99,8 \pm 0,1$          | $65,6 \pm 1,9$ |

\*UC : Ultracentrifugation

Le pourcentage d'adsorption de naringénine n'augmente que très faiblement et avec constance (de 66,9 à 71,9 %) sur la période de 27 h étudiée, et peut alors être considéré comme stable. Nous observons une cinétique d'adsorption plus marquée de la rutine entre 10 min et 2 h (de 18,4 à 24,7 %) qui se stabilise ensuite.

Sur la base de ces résultats, nous avons conclu que les conditions de séparation par ultracentrifugation devaient favoriser le phénomène d'adsorption des actifs en surface des oignons. Cette observation, couplée à la légère précipitation des actifs observée par centrifugation, nous a conduit à choisir la séparation par exclusion stérique pour la suite de nos travaux. Tenant compte de la cinétique d'adsorption des actifs en surface, nous avons optimisé le protocole de préparation des échantillons en appliquant un temps de dispersion systématique de 3 h avant séparation et dosage.

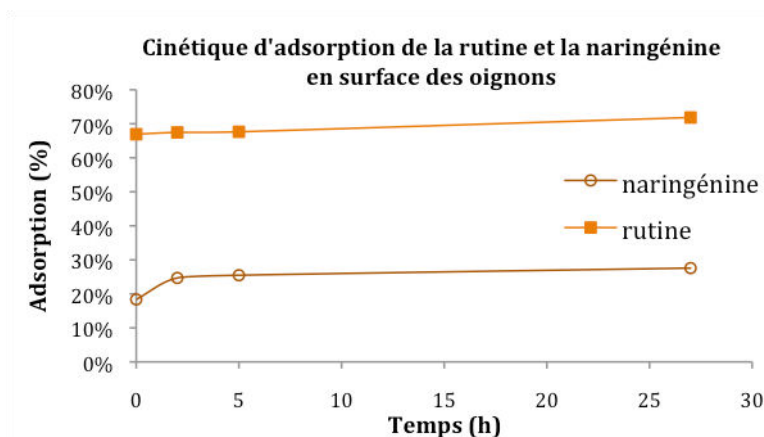


Figure 49 : cinétique d'adsorption de la rutine (289 µg/mL) et de la naringénine (77 µg/mL) sur des oignons blancs en fonction du temps de dispersion avant séparation par exclusion

## 2.2 Phénomène d'adsorption et calcul des rendements d'encapsulation

Le phénomène d'adsorption observé n'est pas surprenant. Dans le cadre d'études sur l'encapsulation d'une protéine dans les oignons, il a été montré que celle-ci pouvait s'adsorber à leur surface [176]. De plus, Van Dijk *et al.* ont démontré que les flavonoïdes avaient une forte affinité avec la surface des vésicules lipidiques [240]. Effectivement, les structures des analytes (rutine et naringénine) et des phospholipides sont propices à la formation de liaisons hydrogènes entre les groupements hydroxyl (-OH) des flavonoïdes et la tête polaire des phospholipides [241].

Ce phénomène d'adsorption mis en évidence, nous nous sommes alors interrogés sur les rendements réels d'encapsulation des actifs à l'intérieur des vésicules et sur la manière de les calculer. Nos expériences nous permettent en effet de mesurer un pourcentage d'adsorption %<sub>A</sub> ainsi qu'un pourcentage d'encapsulation et adsorption %<sub>E+A</sub>, mais pas le pourcentage d'encapsulation %<sub>E</sub> comme schématisé Figure 50.

Pour ce faire, nous avons développé un modèle mathématique présenté ci-dessous.

Le pourcentage d'encapsulation et adsorption est défini comme suit :

$$\%_{E+A} = \frac{m_{E+A}}{m_F + m_A + m_E} \times 100 = \frac{m_{E+A}}{m_E + m_{E+A}} \times 100 \quad (1)$$

Où **m<sub>E+A</sub>** représente la masse d'actifs encapsulés et adsorbés, **m<sub>F</sub>** la masse d'actifs libres, **m<sub>A</sub>** la masse d'actifs adsorbés, et **m<sub>E</sub>** la masse d'actifs encapsulés dans les oignons. Ce pourcentage est mesuré sur une dispersion d'oignons dans lequel l'actif a été encapsulé après séparation par SEC et destruction par TX100 de la fraction contenant les oignons.

Le pourcentage d'adsorption est :

$$\%_A = \frac{m_A}{m_F + m_A} \times 100 \quad (2)$$

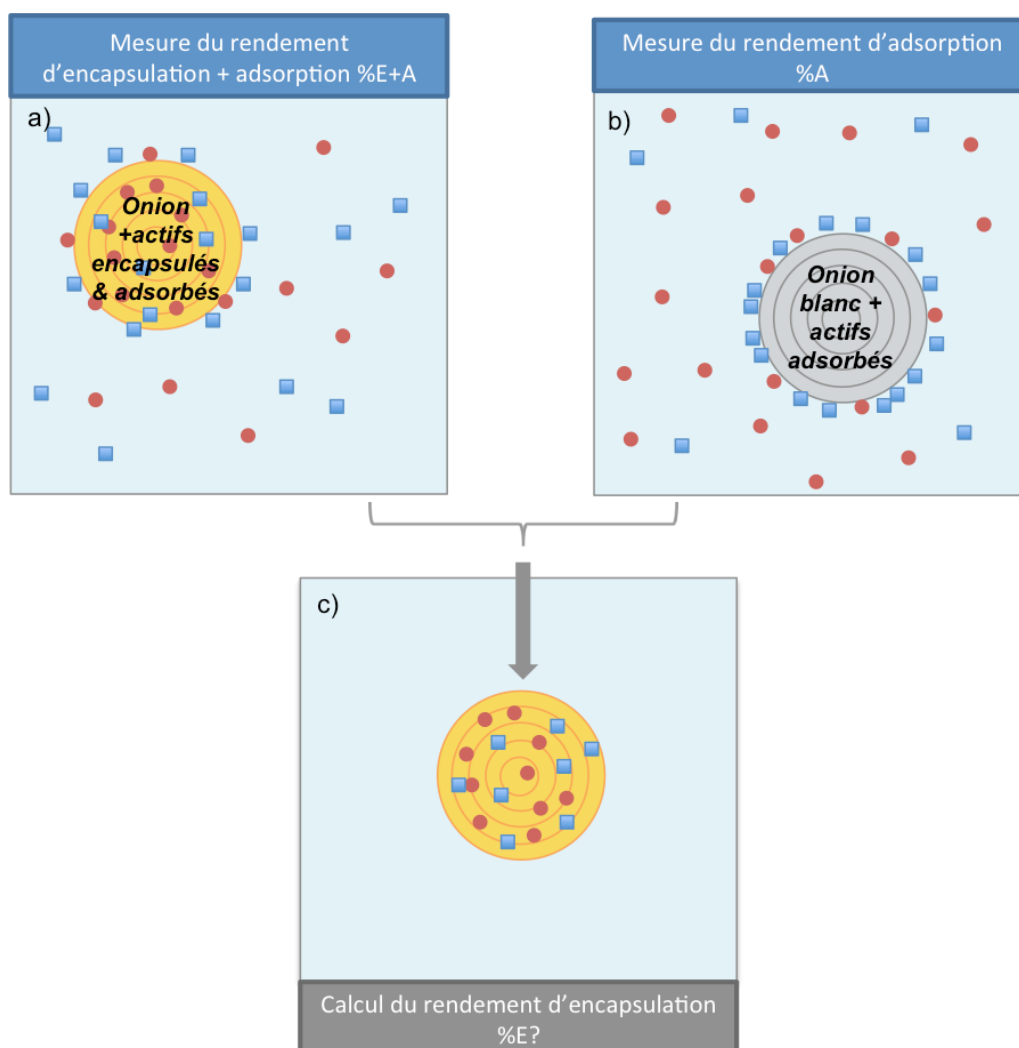


Figure 50 : représentation schématique (a) d'une dispersion d'oignons encapsulant la rutine et la naringénine, (b) d'une dispersion d'oignons blancs dans une solution contenant la rutine et la naringénine et (c) d'un oignon contenant uniquement la rutine et la naringénine encapsulées.

Ce pourcentage est calculé à partir d'oignons « blancs » dispersés dans une solution contenant un actif, après séparation par SEC et destruction par le TX-100. Enfin, le pourcentage d'encapsulation s'écrit :

$$\%_E = \frac{m_E}{m_F + m_{E+A}} \times 100 = \frac{m_{E+A} - m_A}{m_F + m_{E+A}} \times 100 \quad (3)$$

Il est alors possible d'exprimer  $\%_E$  en fonction de  $\%_{E+A}$  et  $\%_A$  comme suit :

L'équation 1 dans l'équation 3 donne :

$$\%_E = \%_{E+A} - \frac{m_A}{m_F + m_{E+A}} \times 100 \quad (4)$$

Les équations 1 et 2 conduisent à :

$$\frac{m_A}{m_F - m_{E+A}} = \frac{\%_A}{100 - \%_A} \times \frac{m_F}{m_F + m_{E+A}} = \frac{\%_A}{100 - \%_A} \left(1 - \frac{\%_{E+A}}{100}\right) \quad (5)$$

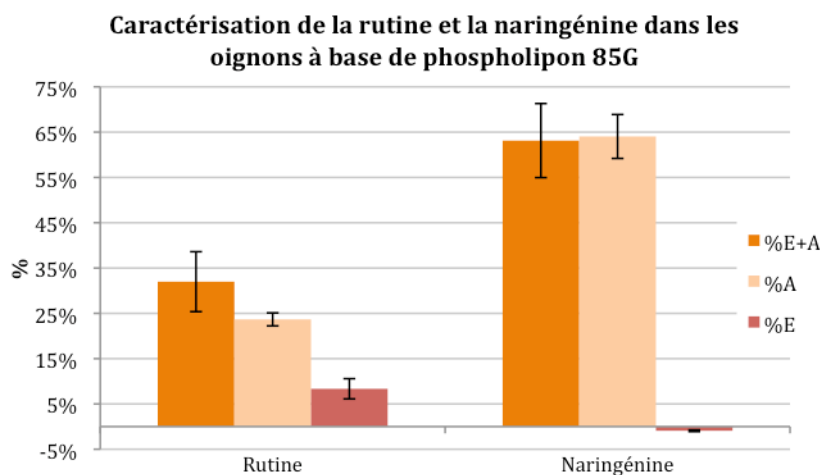
L'équation 5 dans l'équation 4 permet d'obtenir :

$$\%_E = \frac{\%_{E+A} - \%_A}{100 - \%_A} \times 100 \quad (6)$$

Nous obtenons alors une expression du pourcentage d'encapsulation  $\%_E$  en fonction des pourcentages d'adsorption et d'encapsulation+adsorption. Ces deux derniers pouvant être séparément obtenus par l'expérience, nous pouvons dès lors distinguer l'encapsulation de l'adsorption dans les vésicules.

### 2.3 Rendements d'encapsulation des oignons

A partir de l'équation (6) et des mesures des  $\%_{E+A}$  et  $\%_A$  obtenues pour les oignons composés de 55 % (en masse) de phospholipon 85G et 45 % (en masse) de matrice G-PG (glycérine/propylène glycol 60 :40 v/v) contenant 30 mg/mL et 8 mg/mL de rutine et naringénine, nous obtenons un rendement d'encapsulation de la rutine de  $8,4 \pm 2,2$  %. Par contre, nous remarquons que nous n'encapsulons pas la naringénine alors qu'elle est adsorbée à plus de 64 % (Figure 51).



**Figure 51 :** pourcentages d'encapsulation+adsorption  $\%_{E+A}$  et pourcentages d'adsorption  $\%_A$  mesurés pour la rutine et la naringénine dans le système Phospholipon 85G/G-PG 55 : 45 et pourcentages d'encapsulation  $\%_E$  calculés. La matrice G-PG contient 30 mg/mL et 8 mg/mL de rutine et naringénine respectivement.

Ces résultats montrent que le phénomène d'adsorption est ici prédominant pour la rutine et exclusif pour la naringénine. L'adsorption ne peut donc être négligée dans nos systèmes. Même si la rutine est partiellement encapsulée, elle ne l'est que très faiblement, montrant alors que ce système n'est pas optimisé à ce stade.

### 3. SUBSTITUTION DU PHOSPHOLIPIDE

Les faibles rendements d'encapsulation obtenus, ainsi que la cessation de production du phospholipide 85G utilisé dans la composition précédemment exposée, nous ont amenés à tester de nouveaux phospholipides dans une optique de développement et optimisation du système. Après une recherche auprès de nouveaux fournisseurs, nous avons obtenu et sélectionné deux grades de phospholipides riches en phosphatidylcholine (PC) et contenant de la lysophosphatidylcholine (LysoPC) : l'Emulmetik 930 (Unipex, Lucas Meyer) et le Lipoid 75H (Cosmetochem, Lipoid).

L'Emulmetik 930 est déjà décrit dans le Tableau 45 et avait été testé lorsque la phase hydrophile était de l'eau. Le Lipoid 75H contient quant à lui 71,3 % de PC et LysoPC avec moins de 5 % de LysoPC.

#### 3.1 Microscopie

Nous avons formulé des oignons de composition lipides/phase hydrophile 55 : 45 (m :m) avec ces deux phospholipides. Des essais ont été réalisés avec trois phases hydrophiles :

- Eau
- Mélange G-PG
- Mélange G-PG+ rutine/naringénine 30/8 mg/mL

La formation d'oignons a été validée pour les deux phospholipides testés : l'Emulmetik 930 et le Lipoid 75H. Nous noterons que les concentrations de 8 et 30 mg/mL étudiées correspondent aux limites de solubilités obtenues lorsque les actifs ont été solubilisés dans le G-PG sous agitation magnétique, à 30 °C.

#### 3.2 Granulométrie

Les mesures de granulométrie ont été réalisées sur le même modèle qu'en 3.2 (même ratio lipides/phase aqueuse et mêmes phases aqueuses). Les résultats montrent que lorsque la phase hydrophile est composée d'eau, la taille des particules est systématiquement supérieure aux tailles mesurées lorsque la phase aqueuse est substituée par le mélange G-PG, et ce quelque soit le phospholipide considéré. Comme précédemment, nous observons que la présence des actifs n'influence pas ou très peu la taille des particules. Enfin, une différence est observée entre les deux matières premières testées. En effet, les particules à base de G-PG sont systématiquement plus petites avec le Lipoid 75H (pic à 316 nm avec ou sans actif) qu'avec l'Emulmetik 930 (pic à 417 nm sans actif et à 479nm avec les actifs).

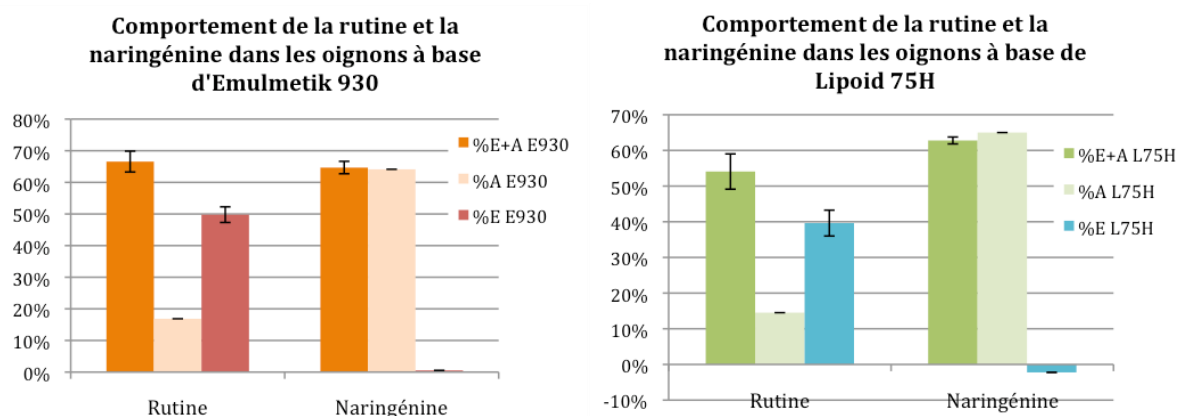


**Figure 52 : distribution volumique de la taille des vésicules formulées avec l'Emulmetik 930 et le Lipoid 75H, suivant un ratio lipides/phase aqueuse 55 : 45, en fonction de la nature de la phase aqueuse : eau, G-PG et G-PG + rutine et naringénine à 30 et 8 mg/mL respectivement.**

### 3.3 Rendements d'encapsulation

Les rendements d'encapsulation+adsorption,  $\%_{E+A}$ , mesurés à partir de ces deux phospholipides sont bons pour les deux actifs (Figure 53). En effet, les  $\%_{E+A}$  de la rutine sont de  $66,6 \pm 3,3 \%$  avec l'Emulmetik 930 et de  $54,1 \pm 4,9 \%$  avec le Lipoid 75H, ce qui est nettement supérieur aux résultats que nous avons obtenus avec le Phospholipon 85G ( $32,0 \pm 6,6 \%$ ). Les  $\%_{E+A}$  obtenus pour la naringénine sont équivalents à ceux obtenus avec le Phospholipon 85G ( $\%_{E+A} = 63,1 \pm 8,2 \%$ ), avec  $\%_{E+A} = 64,7 \pm 2,0$  pour l'Emulmetik 930 et  $\%_{E+A} = 62,8 \pm 1,0 \%$  pour le Lipoid 75H.

Nous observons de nouveau une adsorption systématique des actifs en surface des oignons. Cette adsorption demeure relativement faible pour la rutine avec environ 15 % d'adsorption avec les deux lipides. Par contre, comme précédemment, l'adsorption de la naringénine est très importante et équivalente aux  $\%_{E+A}$  mesurés. L'application du calcul pour obtenir les rendements d'encapsulation des actifs montre alors que la rutine est encapsulée à  $49,8 \pm 2,5 \%$  avec l'Emulmetik 930 et à  $39,6 \pm 3,6 \%$  avec le Lipoid 75H. Ces résultats sont supérieurs à ceux obtenus avec le phospholipon 85G, rendant ces matières premières plus intéressantes. L'Emulmetik 930 se distingue alors par le plus haut rendement d'encapsulation de la rutine. Puis, nous constatons de nouveau que, quelque soit le phospholipide, la naringénine n'est pas encapsulée mais seulement fortement adsorbée.



**Figure 53 : pourcentages d'encapsulation+adsorption  $\%_{E+A}$  et pourcentage d'adsorption  $\%_A$  mesurés pour la rutine et la naringénine dans le système (à gauche) Emulmetik 930/G-PG 55 : 45 et (à droite) Lipoid 75H/G-PG ainsi que les pourcentages d'encapsulation  $\%_E$  calculés. La matrice G-PG contient 30 mg/mL et 8 mg/mL de rutine et naringénine respectivement.**

Pour terminer la comparaison des phospholipides, nous avons souhaité encapsuler chaque actif séparément (Figure 54), puisque jusqu'à présent les études avaient été faites sur l'encapsulation du mélange d'actifs. En effet, les différences de résultats

obtenus pour chacun d'eux nous permettent de penser à une éventuelle compétition entre les deux molécules.

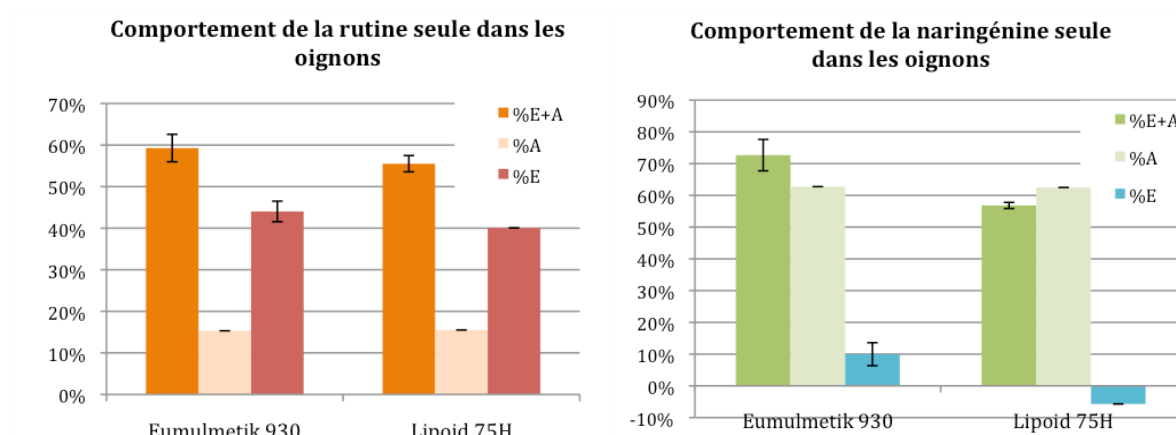


Figure 54 : pourcentages d'encapsulation+adsorption  $\%E+A$  et pourcentages d'adsorption  $\%A$  mesurés pour (à gauche) la rutine seule et (à droite) la naringénine seule dans les systèmes phospholipides/G-PG 55 : 45 ainsi que les pourcentages d'encapsulation  $\%E$  calculés. La matrice G-PG contient (à gauche) 30 mg/mL de rutine et (à droite) 8 mg/mL de naringénine.

Le comportement de la rutine dans les oignons reste semblable aux observations précédentes, avec des pourcentages d'encapsulation et adsorption supérieurs à 55 % et des pourcentages d'adsorption d'environ 15 %, et ce quelle que soit la nature du phospholipide. Nous notons tout de même des pourcentages d'encapsulation légèrement inférieurs à ceux trouvés lorsque les molécules étaient mélangées. L'Emulmetik demeure le phospholipide qui donne les meilleurs résultats avec ici 44,0 % d'encapsulation de la rutine contre 40,1 % avec le Lipoid 75H.

La naringénine évaluée seule présente de nouveau de très hauts pourcentages d'adsorption (supérieurs à 62 %). Le Lipoid 75H ne permet toujours pas d'encapsuler cette molécule. Par contre, nous obtenons 10,0 % d'encapsulation grâce à l'Emulmetik 930 alors que cet actif n'était pas encapsulé en présence de rutine. Il semblerait donc que la rutine empêche l'encapsulation de la naringénine.

Par ailleurs, quels que soient les cas étudiés, l'Emulmetik 930 est le phospholipide qui a donné les meilleurs résultats d'encapsulation. Nous l'avons donc validé pour la suite des travaux.

### PARTIE III : OPTIMISATION DES OIGNONS

L'optimisation du système d'encapsulation a été réalisée en plusieurs étapes. Nous avons commencé par comparer les rendements d'encapsulation en fonction de la concentration en analytes dans un système de composition lipide/G-PG fixe. Puis, nous avons ensuite étudié le système en faisant varier la quantité de lipides afin d'optimiser les rendements d'encapsulation et enfin, nous avons finalisé l'optimisation en évaluant la concentration optimale en rutine pouvant être encapsulée. L'objectif de cette étude a été d'obtenir une composition permettant l'encapsulation d'un maximum d'analyte(s).

## 1. RENDEMENTS D'ENCAPSULATION EN FONCTION DES CONCENTRATIONS EN ANALYTES

Cette première optimisation a été réalisée sur l'encapsulation simultanée de la rutine et la naringénine. Comme précédemment, la composition massique en lipides/solution d'analytes a été fixée à 55 :45 (m :m). Nous avons également conservé la concentration initiale en analytes dans la solution à encapsuler à 30 mg/mL (49,1  $\mu$ mol/mL) en rutine et 8 mg/mL (29,4  $\mu$ mol/mL) en naringénine, soit un rapport massique entre les deux analytes de 3,75. Cette solution constitue la solution mère en analytes.

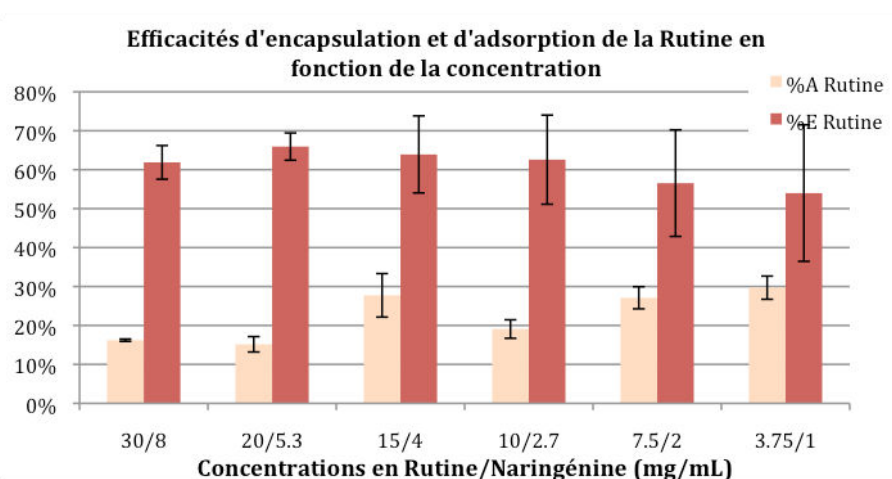


Figure 55 : dosage et calcul des rendements d'adsorption et d'encapsulation de la rutine en fonction des concentrations en rutine et naringénine

La première étape a consisté en l'évaluation des rendements d'encapsulation en fonction des concentrations en analytes, en conservant le rapport massique à 3,75. Les dilutions de la solution à encapsuler ont été réalisées à partir de la solution mère et d'une solution de glycérine/propylène glycol 60 : 40 v/v. Comme exposé Figure 55 et Figure 56, 5 dilutions ont été testées. Des mesures d'adsorption d'une part, et d'encapsulation et adsorption d'autre part, ont systématiquement été effectuées afin d'en déduire les pourcentages d'encapsulation conformément à l'équation (6).

Nous mesurons alors entre 15 et 30 % d'adsorption de la rutine et le pourcentage d'adsorption tend à diminuer lorsque les concentrations en rutine et naringénine augmentent (Figure 55). La tendance inverse est obtenue pour le rendement d'encapsulation : plus la solution de G-PG est concentrée en actifs, plus le rendement tend à augmenter. Aux concentrations testées, il semblerait que nous n'observions pas de phénomène de saturation. La quantité de rutine encapsulée augmente donc avec sa concentration. Nous obtenons systématiquement de bons rendements d'encapsulation de la rutine. Le plus faible rendement obtenu est  $\%E = 54,0 \% \pm 17,5$  pour les concentrations les plus faibles en rutine et naringénine (3,75 et 1 mg/mL respectivement). Le rendement le plus élevé obtenu est  $\%E = 65,9 \% \pm 3,5$  lorsque la concentration en rutine est de 20 mg/mL et celle en naringénine de 5,3 mg/mL.

La naringénine présente de forts rendements d'adsorption, systématiquement supérieurs à  $52,7 \% \pm 11,4$  et presque toujours supérieurs à  $61,7 \% \pm 2,1$  (Figure 56). Sur la base des taux d'encapsulation calculé et des barres d'erreurs obtenues, nous remarquons alors que la naringénine n'est pas ou peu encapsulée (l'erreur est calculée sur la base des erreurs mesurées pour les taux d'adsorption et d'encapsulation+adsorption).

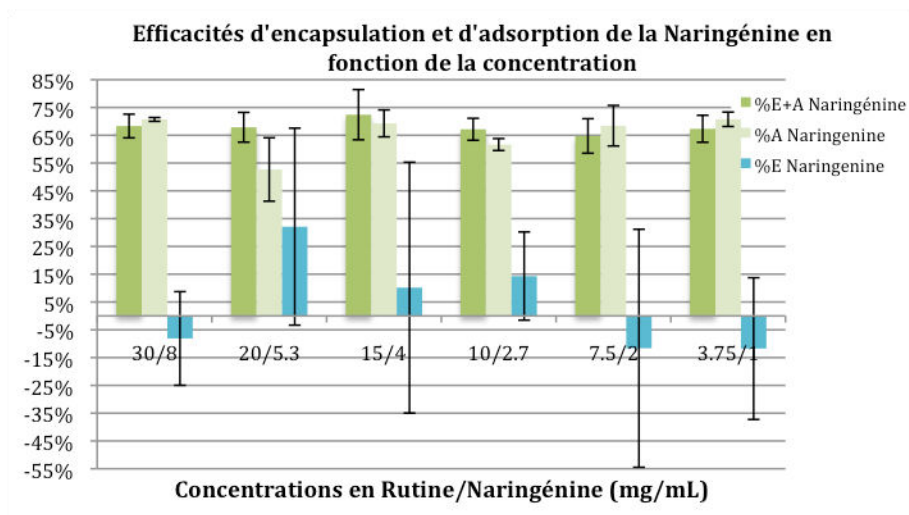
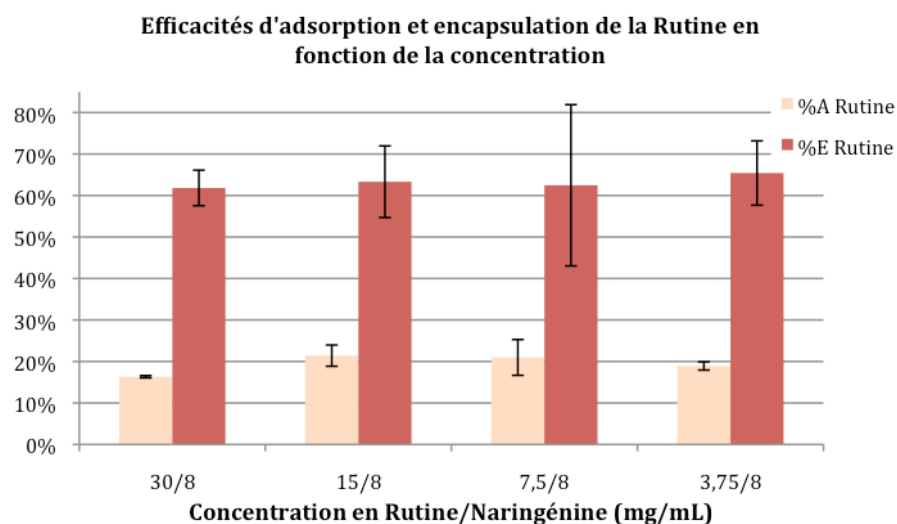


Figure 56 : rendements d'adsorption et d'encapsulation de la naringénine en fonction des concentrations en rutine et naringénine

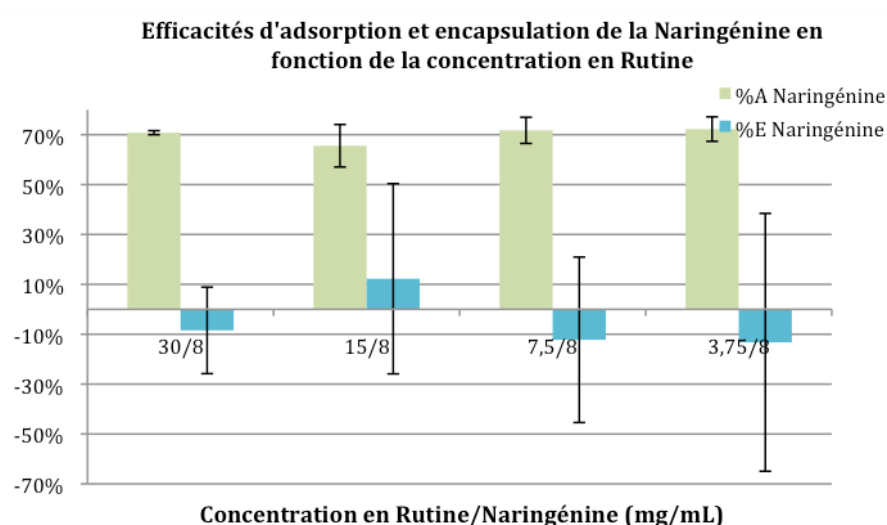
Suite à cette série, nous avons réalisé de nouveaux essais en faisant varier la concentration en rutine de 30 à 3,75 mg/mL, tout en conservant la concentration en naringénine fixée à 8 mg/mL. Notre objectif était de voir si la rutine était en excès à 30 mg/mL. En effet Faure et al. [178] ont montré que, pour un rapport lipides/actif fixé, le rendement d'encapsulation dans les oignons est constant tant que l'actif n'est pas en excès. Au-delà, le rendement d'encapsulation chute. L'optimisation de la formulation des oignons consiste à se placer à cette frontière entre les deux comportements : pour cette concentration d'actifs, le nombre d'actifs encapsulé est maximal.

La rutine présente des pourcentages d'adsorption variant de  $16,3 \pm 0,3 \%$  à  $21,4 \pm 2,6 \%$  (Figure 57). Comme précédemment, cet actif est fortement encapsulé, avec des rendements systématiquement supérieurs à 60,0 %. Le rendement le plus faible est de  $61,8 \pm 4,3 \%$ , obtenu pour la concentration en rutine la plus élevée. Et nous observons une légère augmentation des rendements d'encapsulation lorsque la concentration en rutine diminue, avec un maximum de  $65,4 \pm 7,8 \%$  pour 3,75 mg/mL de rutine. Toutefois, ces faibles variations de rendements d'encapsulation nous amènent à conclure que la rutine n'est pas en excès, même à 30 mg/mL. Nous aurions donc pu augmenter la concentration en rutine dans nos échantillons mais à ce stade, la solubilité limitée de cet actif nous en a empêché.



**Figure 57 : rendements d'adsorption et d'encapsulation de la rutine en fonction de la concentration en rutine, à concentration fixée en naringénine (8 mg/mL)**

Quelle que soit la concentration en rutine, la naringénine est très fortement adsorbée, avec des rendements variant de  $65,6 \pm 8,5 \%$  à  $72,2 \pm 4,9 \%$  (Figure 58). Nous observons que la naringénine n'est jamais encapsulée (voir barres d'erreurs).



**Figure 58: rendements d'adsorption et d'encapsulation de la naringénine en fonction de la concentration en rutine, à concentration fixée en naringénine (8 mg/mL)**

Nous avons alors envisagé qu'il pouvait y avoir une compétition entre les deux actifs et avons souhaité encapsuler la naringénine seule (Figure 59). La concentration de l'actif a été fixée à 8 mg/mL pour la réalisation de ces essais. Nous notons de nouveau une forte adsorption de l'actif ( $59,2 \pm 5,6 \%$ ), se distinguant peu du résultat d'encapsulation et adsorption ( $64,9 \pm 8,5 \%$ ) et donnant alors un rendement d'encapsulation de  $13,8 \pm 34,6 \%$ . Ce rendement demeure faible et similaire aux résultats obtenus en présence de la rutine.

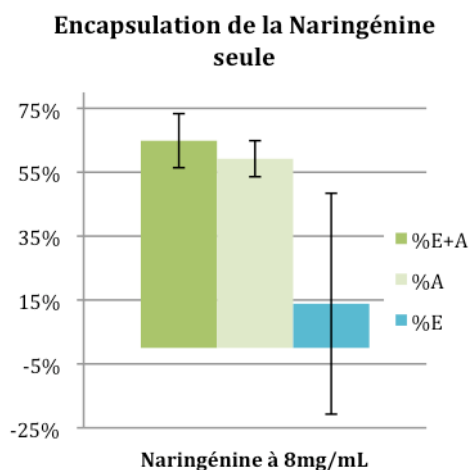


Figure 59 : rendements d'adsorption et d'encapsulation d'une solution de naringénine à 8 mg/mL

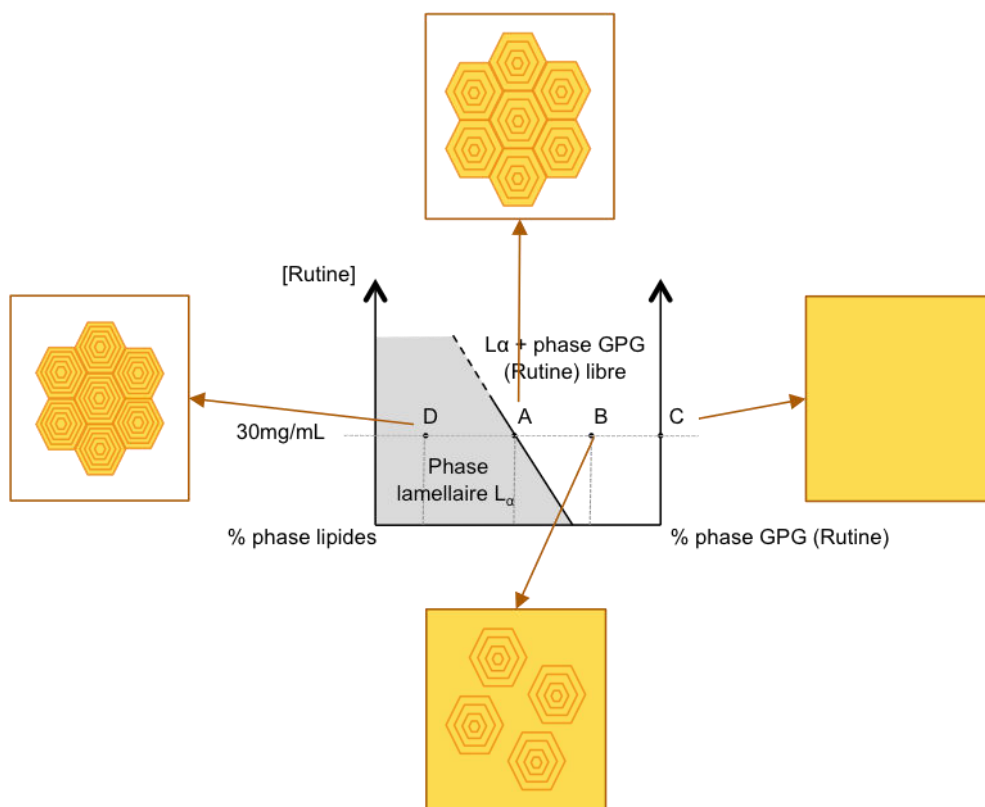
Ainsi nous observons que le système permet d'immobiliser environ 80 % de chacun des deux actifs évalués, quelle que soit leur concentration. Mais ils se différencient très nettement par leur partage à l'intérieur ou en surface des oignons. En effet, la rutine est majoritairement encapsulée (environ 65 %) pour de faibles rendements d'adsorption (environ 20 %). A l'inverse, la naringénine est fortement adsorbée (environ 70 %) et pas ou peu encapsulée (environ 12 %). Plusieurs explications peuvent être envisagées. En premier lieu, ces différences peuvent être expliquées par la masse molaire de la naringénine (272 g/mol) qui est inférieure à celle de la rutine (610 g/mol). La naringénine, plus petite, peut alors fuir plus facilement à travers les membranes phospholipidiques. Par ailleurs, la naringénine étant faiblement polaire, son adsorption en surface des oignons est alors privilégiée par rapport à sa solubilisation dans l'eau, solvant de dispersion. En second lieu, la configuration des molécules peut influencer leur facilité d'intercalation dans les membranes phospholipidiques. Comme montré par Van Dijk et *al.*, les flavonols (rutine), de configuration plane, s'intercaleront plus facilement dans les membranes vésiculaires que les flavonones (naringénine), de configuration courbée. [240]. Enfin, Pawlikowsja et *al.* ont conclu que les petits flavonoïdes se localisent préférentiellement dans la partie « haute » des bicouches, interagissant avec les groupes polaires *via* des liaisons hydrogènes. Ces éléments pourraient expliquer pourquoi la rutine est retenue au sein des vésicules alors que la naringénine est davantage en surface.

## 2. RENDEMENTS D'ENCAPSULATION EN FONCTION DE LA COMPOSITION DU SYSTEME

### 2.1 Rendements d'encapsulation

Les rendements d'encapsulation de la rutine étant très supérieurs à ceux obtenus pour la naringénine, nous avons optimisé la formulation des oignons avec la rutine uniquement. Ayant obtenu un bon rendement d'encapsulation pour la plus forte

concentration en rutine réalisée (30 mg/mL), nous avons travaillé dans ces conditions de concentration.

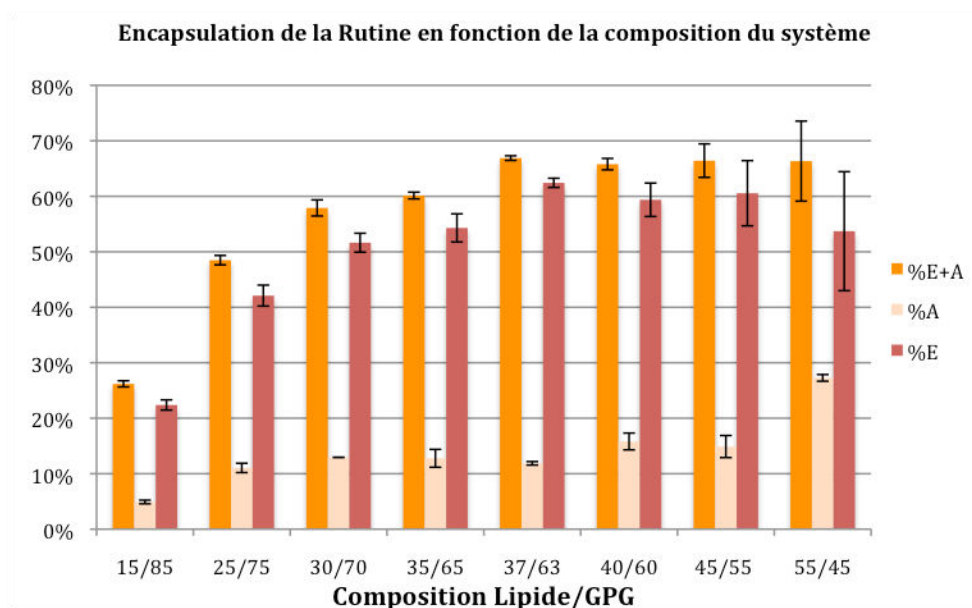


**Figure 60 : représentation schématique du diagramme de phase de la composition lipide/G-PG. Le point D se situe dans le domaine monophasique constitué de phase lamellaire, le point A se situe à la frontière du domaine monophasique et est composé de phase lamellaire gonflée au maximum, le point B se situe dans le domaine biphasique et est composé de phase lamellaire gonflée au maximum en présence d'un excès de phase G-PG, et le point C n'est composé que de phase G-PG (monophasique)**

Des études antérieures ont montré que l'efficacité d'encapsulation maximale des oignons est régie par la limite de gonflement des bicouches lamellaires les constituant [178]. En effet, en ajoutant une phase aqueuse à des phospholipides, ces derniers s'organisent en une succession de bicouches séparées par une phase aqueuse : la phase lamellaire. Pour de faibles quantités de phase aqueuse, les bicouches sont proches les unes des autres, séparées par cette petite quantité de phase. Lorsque l'on augmente les proportions en phase aqueuse, la distance entre les bicouches augmente : la phase lamellaire «gonfle ». A un certain stade, la quantité de phase aqueuse que peut supporter le système atteint un maximum (gonflement maximal). Toute phase aqueuse supplémentaire ne pénètre plus entre les bicouches, mais se trouve en excès, formant alors un système diphasique. Ainsi, la formulation optimale en terme de rendement d'encapsulation est celle à la frontière entre les domaines monophasique et diphasique des phases lamellaires (point A de la Figure 60)

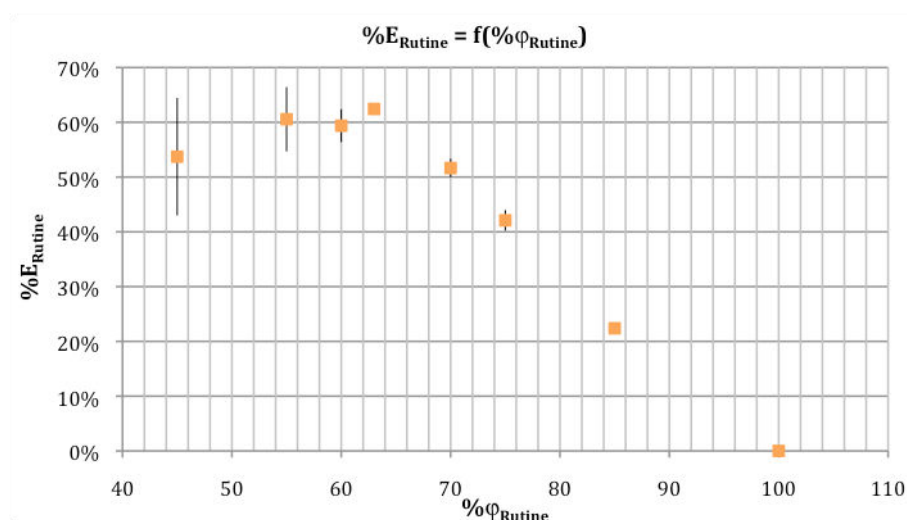
Dans le but de trouver cette formulation optimale, nous avons préparé différents échantillons variant dans leurs rapports massiques lipide/G-PG de 55/45 (m/m) à 15/85 (m/m) (Figure 61). Pour rappel, la phase G-PG contient la rutine (30 mg/mL).





**Figure 61 : dosage et calcul des rendements d'adsorption et d'encapsulation de la rutine en fonction de la composition massique lipide/G-PG. La rutine est solubilisée à 30 mg/mL dans la matrice G-PG**

L'évolution du pourcentage d'encapsulation en fonction du pourcentage en phase G-PG contenant la rutine est représenté Figure 62. Ce graphique montre une légère augmentation du rendement d'encapsulation de la rutine de  $53,7 \pm 2,0$  % à  $62,4 \pm 0,6$  % lorsque la proportion en phase G-PG augmente de 45 à 63 %, suivi par une chute linéaire des rendements.



**Figure 62 : rendement d'encapsulation de la rutine en fonction de la concentration massique en phase GPG contenant la rutine à 30 mg/mL dans le système lipide/GPG**



## 2.2 Définition de la composition optimale – Modèle mathématique

Afin de déterminer la composition optimale du système, nous avons développé un modèle mathématique qui s'appuie sur le diagramme de phases représenté Figure 63 et basé sur les résultats portés sur la Figure 62.

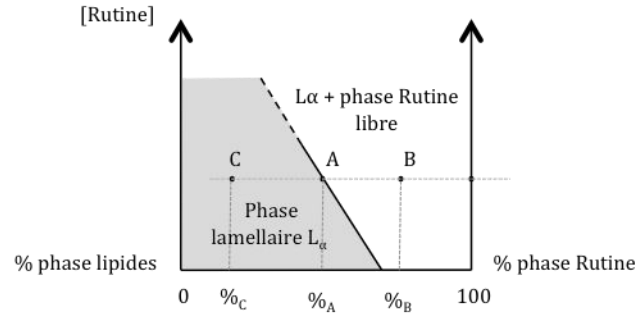


Figure 63 : représentation schématique du diagramme de phase des oignons en fonction de la composition du système

La composition C du diagramme de phase correspond à un échantillon fait d'oignons concentrés (domaine de phase lamellaire  $L_\alpha$ ). En ce point, la majeure partie de la rutine est encapsulée à l'intérieur des oignons et le pourcentage d'encapsulation sera noté  $\%E_\alpha$ . La composition A correspond à un échantillon fait d'oignons concentrés, dans un état de gonflement maximal de la phase lamellaire. La composition B correspond à un échantillon diphasique où des oignons contenant la rutine sont en présence de la phase G-PG contenant la rutine, en excès

Nous pouvons dès lors modéliser l'évolution du pourcentage d'encapsulation ( $\%E$ ) en fonction des proportions en phase G-PG contenant la rutine ( $\% \phi_{\text{Rutine}}$ ).

### 2.2.1 Domaine diphasique : échantillon B

Le pourcentage d'encapsulation de la rutine est défini par :

$$\%E_{rut,B} = \frac{m_{rut,B}^{enc}}{m_{rut,B}^t} \times 100 = \frac{m_{rut,B}^{enc}}{\%B \times m_B^t} \times 100 \quad (7)$$

Avec  $m_{rut,B}^{enc}$  la masse de phase rutine encapsulée dans l'échantillon de composition B,  $m_{rut,B}^t$  la masse totale de phase rutine dans l'échantillon de composition B,  $m_B^t$  la masse totale d'échantillon B (fait de lipides et de phase rutine), et  $\%B$  le pourcentage massique de phase rutine dans l'échantillon B.

Nous basant sur l'hypothèse que la quantité de rutine dans les oignons est fixée par le ratio lipides/rutine défini par le point A, nous pouvons alors exprimer la masse de rutine dans les oignons au point B comme suit :

$$m_{rut,On,B} = \frac{m_{lip,B} \times m_{rut,A}}{m_{lip,A}} \quad (8)$$

Avec  $m_{lip,B}$  et  $m_{lip,A}$  les masses de lipides dans les échantillons B et A respectivement et  $m_{rut,A}$  la masse de rutine dans l'échantillon A.

L'équation (8) peut être exprimée en utilisant le pourcentage de rutine dans l'échantillon de la manière suivante :

$$m_{rut,On,B} = \frac{(100 - \%B) \times \%A}{(100 - \%A)} \times m_B^t \quad (9)$$

Avec  $\%A$  le pourcentage massique de phase rutine dans l'échantillon A.

Supposant toujours que la quantité de rutine encapsulée dans les oignons est constante et correspond à celle de la composition A, nous noterons le pourcentage d'encapsulation correspondant  $\%E_{rut,On}$ . La quantité de rutine encapsulée en B est alors donné par :

$$m_{rut,B}^{enc} = \frac{\%E_{rut,On}}{100} \times m_{rut,On,B} \quad (10)$$

En utilisant les équations (9) et (8) dans l'équation (7), nous obtenons :

$$\%E_{rut,B} = \%E_{rut,On} \times \frac{(100 - \%B) \times \%A}{(100 - \%A)} \times \frac{1}{\%B} \quad (11)$$

L'équation (11) peut être exprimée ainsi :

$$\%E_{rut,B} \times \%B = \frac{100\%E_{rut,On}\%A}{(100 - \%A)} - \frac{\%E_{rut,On}\%A}{(100 - \%A)} \times \%B \quad (12)$$

Sur la base de ce modèle, en traçant, nous devrions obtenir dans le domaine diphasique, une droite de pente  $S_d = \frac{\%E_{rut,On}\%A}{(100 - \%A)}$ .

### 2.2.2 Domaine monophasique : échantillon C

L'échantillon C se trouve dans le domaine monophasique dans lequel des oignons concentrés contenant de la rutine sont présents. D'après nos hypothèses, le pourcentage d'encapsulation y est constant et égal à  $\%E_{rut,On}$ . Ainsi, en traçant  $\%E_{rut} \times \%Rut$  en fonction de  $\%Rut$  dans le domaine monophasique, nous devrions obtenir une droite passant par l'origine et de pente  $S_m = \%E_{rut,On}$ .

### 2.2.3 Limite entre les deux domaines : échantillon A

Les deux droites précédemment définies devraient se couper en un point qui définira la composition du point A, limite entre les deux domaines et définition du système de composition optimale pour une concentration en rutine fixée.

### 2.2.4 Composition optimale

En traçant  $\%E_{rut} \times \%Rut = f(\%Rut)$  à partir des données expérimentales, nous obtenons bien les deux droites, comme prévu par le modèle (Figure 64). La première droite a une pente de 0,6091, valeur qui correspond – d’après le modèle – au pourcentage optimal d’encapsulation pour le système optimisé, soit 60,9 %. La deuxième droite a une pente de -1,2212, correspondant à  $\frac{\%E_{rut,On}\%A}{(100-\%A)}$ . Nous pouvons dès lors en déduire la composition optimale en phase rutine  $\%A$  qui vaut 66,7 %. Ainsi, le gonflement maximum de la phase lamellaire est obtenu pour une composition en lipides/phase rutine 33 : 67 lorsque la concentration en rutine est de 30 mg/mL. Nous notons par ailleurs que les deux droites s’interceptent pour  $\%\phi_{Rutine} = 67\%$  et par déduction  $\%E_{Rutine} = 60\%$ , confirmant ainsi les résultats calculés.

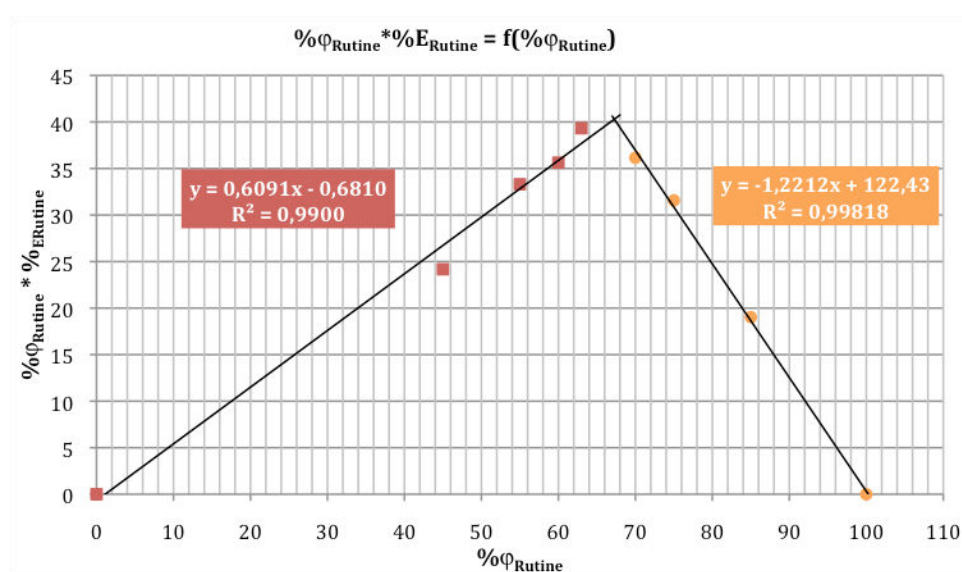


Figure 64 : tracé de  $\%\phi_{Rutine} * \%E_{Rutine} = f(\%\phi_{Rutine})$  dont l'intersection donne la composition optimale du système lipide/G-PG 33 : 67

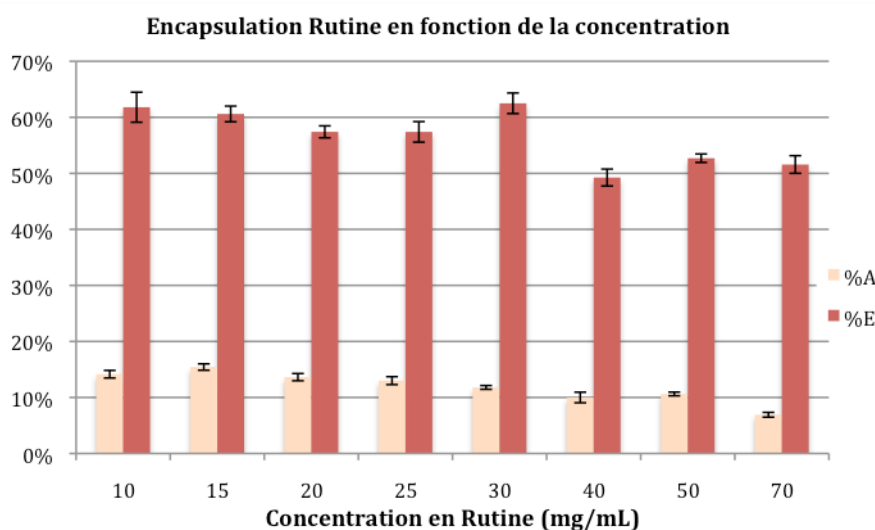
### 3. RENDEMENTS D'ENCAPSULATION EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN RUTINE – MODELE MATHEMATIQUE

L'objectif de cette partie a été de déterminer la concentration optimale en rutine dans le système d'encapsulation.

#### 3.1 Rendements d'encapsulation

Nous avons fixé le rapport lipide/G-PG à 33 : 67, composition optimale trouvée dans la partie précédente. Dans ce système, nous avons alors fait varier la concentration en rutine de manière à observer les fluctuations des rendements d'encapsulation dans ces nouvelles conditions. Nous avons travaillé sur 8 concentrations, de 10 à 70 mg/mL de rutine dans le G-PG. Les concentrations en rutine supérieures à 30 mg/mL ont pu être obtenues en optimisant les conditions de solubilisation, notamment par l'utilisation d'un bain à ultrasons. Comme le montrent les résultats exposés Figure 65, nous obtenons des pourcentages d'adsorption variant de 6 à 15 %, cette valeur diminuant lorsque la concentration en rutine augmente. Alors que les pourcentages d'encapsulation calculés restent relativement stables (entre  $57,4 \pm 1,1$  % et  $62,5 \pm 1,8$  %) pour les concentrations les plus basses (entre 10 et 30 mg/mL), nous observons qu'à partir de 40 mg/mL en rutine, le pourcentage d'encapsulation diminue à 50 % environ.

Cette première observation nous permet de supposer que la concentration optimale en rutine doit se situer entre 30 et 40 mg/mL. Afin de traiter au mieux ces données, nous avons cherché à les interpréter grâce à un modèle mathématique en raisonnant sur notre compréhension du comportement physico-chimique du système.



**Figure 65 : rendements d'adsorption et d'encapsulation de la rutine en fonction de la concentration en rutine (10 à 70 mg/mL) pour une composition massique lipide/G-PG fixée à 33 : 67.**

### 3.2 Définition de la concentration optimale – Modèle mathématique

Dans l'élaboration de ce modèle mathématique, la composition du système lipide/G-PG est fixe alors que nous faisons varier la concentration en rutine dans le G-PG, ce qui correspond à un déplacement vertical sur le diagramme de phases représenté Figure 66.

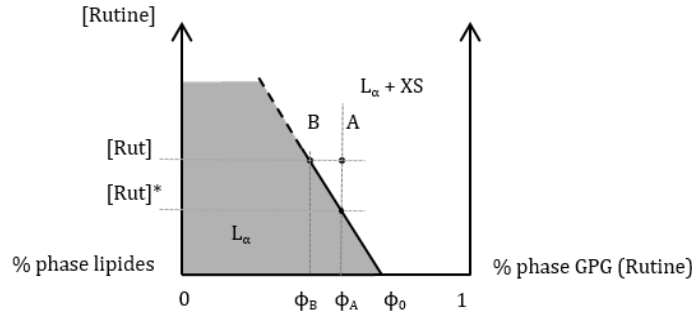


Figure 66 : représentation schématique du diagramme de phases des oignons en fonction de la composition.  $L_\alpha$  correspond à la phase lamellaire et XS à la phase en excès de G-PG contenant la rutine non encapsulée.

Comme précédemment, nous supposons que le pourcentage d'encapsulation dans le domaine monophasique est constant. Nous le noterons ici  $\%E_m$ .

Dans le domaine diphasique, le pourcentage d'encapsulation de la rutine est défini par l'équation :

$$\%E_d = \frac{n_{L_\alpha}^{Rut}}{n_{L_\alpha}^{Rut} + n_{XS}^{Rut}} \%E_m = \frac{[Rut]_{L_\alpha} \times V_{L_\alpha}}{[Rut]_{L_\alpha} \times V_{L_\alpha} + [Rut]_{XS} \times V_{XS}} \%E_m \quad (13)$$

Où  $n_{L_\alpha}^{Rut}$  est la quantité de matière de rutine dans la phase lamellaire,  $n_{XS}^{Rut}$  la quantité de matière de rutine dans la phase en excès XS,  $[Rut]_{L_\alpha}$  la concentration en rutine dans la phase lamellaire,  $V_{L_\alpha}$  le volume de la phase lamellaire,  $[Rut]_{XS}$  la concentration en rutine dans la phase en excès et  $V_{XS}$  le volume de phase en excès.

Suivant la règle des leviers, nous pouvons exprimer:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{V_{L_\alpha}}{V_t} = \frac{1 - \phi_A}{1 - \phi_B} \end{array} \right. \quad (14)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{V_{XS}}{V_t} = \frac{\phi_A - \phi_B}{1 - \phi_B} \end{array} \right. \quad (15)$$

Avec  $V_t$  le volume total,  $\phi_A$  la fraction volumique de rutine dans l'échantillon de composition A et  $\phi_B$  la fraction volumique de rutine dans l'échantillon de composition B. En utilisant les équations (14) et (15) dans l'équation (13), nous obtenons:

$$\%E_d = \frac{[Rut]_{L\alpha} \times \frac{1 - \phi_A}{1 - \phi_B} \times V_t}{[Rut]_{L\alpha} \times \frac{1 - \phi_A}{1 - \phi_B} \times V_t + [Rut]_{XS} \times \frac{\phi_A - \phi_B}{1 - \phi_B} \times V_t} \%E_m \quad (16)$$

En définissant  $K = \frac{[Rut]_{XS}}{[Rut]_{L\alpha}}$

$$\%E_d = \frac{\frac{1 - \phi_A}{1 - \phi_B}}{\frac{1 - \phi_A}{1 - \phi_B} + K \times \frac{\phi_A - \phi_B}{1 - \phi_B}} \%E_m = \frac{1 - \phi_A}{1 - \phi_A + K(\phi_A - \phi_B)} \%E_m \quad (17)$$

Comme attendu, si  $\phi_A = \phi_B$  alors  $\%E = \%E_m$ .

### Relation entre $\phi_A$ et $\phi_B$

Nous considèrerons le cas où l'augmentation de la concentration en rutine mène à la transition entre les domaines monophasique et diphasique, c'est-à-dire  $\phi_B < \phi_A < \phi_0$ .

En supposant que la frontière entre les deux domaines est linéaire, sa pente est alors donnée par:

$$\beta = \frac{[Rut] - [Rut]^*}{\phi_B - \phi_A} \quad (18)$$

L'équation (18) peut encore être écrite:

$$\phi_B - \phi_A = \frac{[Rut] - [Rut]^*}{\beta} = \alpha([Rut] - [Rut]^*) \quad (19)$$

Avec  $\alpha = \frac{1}{\beta}$

En utilisant l'équation (19) dans l'équation (17):

$$\%E_d = \frac{1 - \phi_A}{1 - \phi_A + K\alpha([Rut]^* - [Rut])} \%E_m \quad (20)$$

L'inverse de  $\%E_d$  peut alors être écrit:

$$\frac{1}{\%E_d} = \left( \frac{1}{\%E_m} + \frac{K\alpha[Rut]^*}{(1 - \phi_A)\%E_m} \right) - \frac{K\alpha[Rut]}{(1 - \phi_A)\%E_m} \quad (21)$$

En traçant  $\frac{1}{\%E} = f[Rut]$  nous devrions alors obtenir un plateau tant que  $[Rut] \leq [Rut]^*$  (puisque  $K=0$  dans ce cas) correspondant à  $\frac{1}{\%E_m}$ , et ensuite une droite (dès lors que  $[Rut] > [Rut]^*$ ) de pente  $S = -\frac{K\alpha[Rut]}{(1 - \phi_A)\%Lam}$  et d'ordonnée à l'origine  $\frac{1}{\%Lam} - Z[Rut]^*$

### 3.3 Composition optimale

Sur la base de ce modèle, nous avons donc tracé l'inverse du pourcentage d'encapsulation en fonction de la concentration en rutine à partir des résultats expérimentaux (Figure 67). Les résultats obtenus sont en accord avec le modèle. Le plateau observé pour les concentrations les plus faibles définit un pourcentage d'encapsulation maximal de  $59,9 \pm 2,4$  %, ce qui concorde avec les résultats obtenus dans les parties précédentes. La concentration optimale en rutine est définie par l'intersection des droites et se situe à 30 mg/mL.

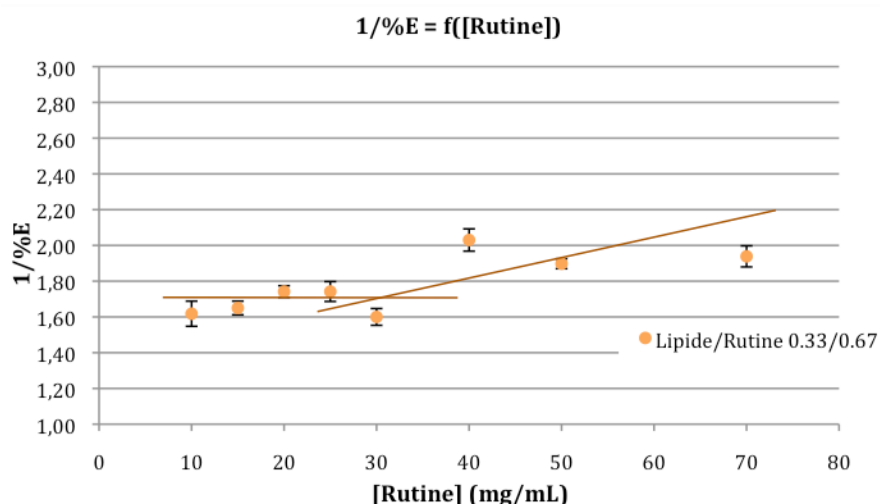


Figure 67 : tracé de l'inverse du pourcentage d'encapsulation en fonction de la concentration en rutine. L'intersection des droites définit la concentration optimale en rutine, 30 mg/mL.

Dans l'idée d'affiner notre compréhension du comportement du système, nous avons réalisé ces mêmes essais de variation de la concentration en rutine sur un système de composition lipides/G-PG fixé à 25 : 75. Pour ce cas particulier, nous n'avons pas réalisé les essais d'adsorption et nous nous sommes seulement concentrés sur les résultats d'encapsulation et d'adsorption. En effet, nous avons pu remarquer tout au long de nos essais que les tendances observées entre l'encapsulation d'une part et l'encapsulation et adsorption d'autre part sont les mêmes (les taux d'absorption étant faibles, cela peut expliquer que l'on puisse travailler avec le taux d'immobilisation, c'est-à-dire le taux de molécules encapsulées et adsorbées). Aussi avons nous pu comparer ces nouvelles données avec celles obtenus pour le système lipides/G-PG 33 : 67 (Figure 68). Avec ce nouveau ratio, nous observons de nouveau un plateau aux faibles concentrations en rutine puis une droite aux concentrations plus élevées. Par comparaison avec le système précédent, nous remarquons que les droites se coupent pour une concentration en rutine plus faible, 15 mg/mL. Ainsi, nous pouvons en conclure logiquement que lorsque la quantité de lipides dans le système diminue, le domaine monophasique se restreint et les concentrations d'encapsulation optimale diminuent.

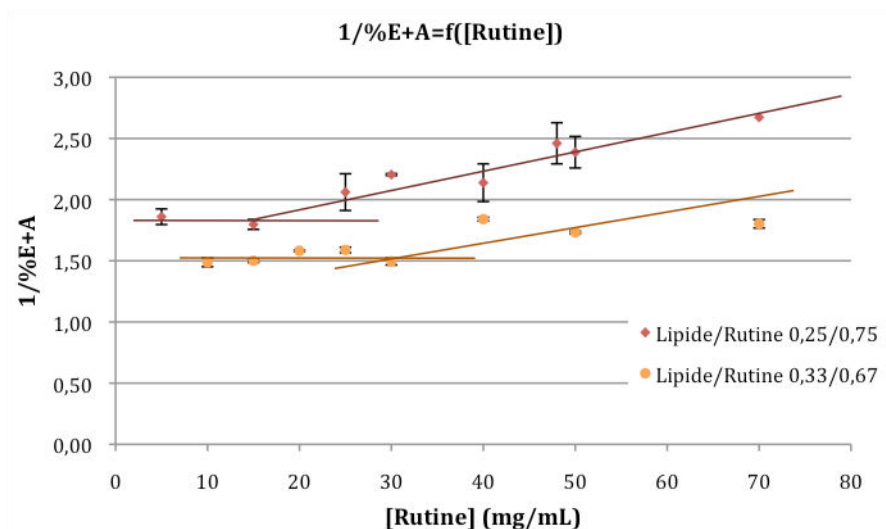


Figure 68 : tracé de l'inverse des pourcentages d'encapsulation et adsorption en fonction de la concentration en rutine pour les systèmes lipides/G-PG 33 : 67 et 25 : 75.

## 4. CONCLUSION

Ainsi, les essais réalisés ont permis d'optimiser l'encapsulation de la rutine dans les oignons et de définir que la composition optimale comporte 33 % de lipides et 67 % de G-PG contenant 30 mg/mL de rutine. Ce système permet d'encapsuler 62,5 % de la rutine, soit 16,54  $\mu\text{mol}$  de rutine par gramme d'oignons. Cette valeur est supérieure à celle obtenue par Park *et al.* qui sont parvenus à encapsuler la rutine à 58 % dans des liposomes à base de céramide [242]. Une autre étude d'encapsulation de la rutine dans des liposomes a été réalisée par Gonirotaki *et al.* qui ont obtenu  $71 \pm 10$  % d'encapsulation [243]. Cependant, Gonirotaki *et al.* n'ont pas réalisé de mesures d'adsorption. Si nous considérons notre résultat combinant l'encapsulation et l'adsorption, nous avons obtenu pour ce système  $66,9 \pm 1,3$  % de rétention de la rutine. Ce résultat est tout à fait comparable à celui de M. Gonirotaki *et al.* si nous considérons leur déviation standard.

Enfin, les données expérimentales recueillies sont conformes aux modèles mathématiques développés qui peuvent alors servir de base dans le cadre de l'optimisation de nouveaux systèmes d'encapsulation de type oignons.

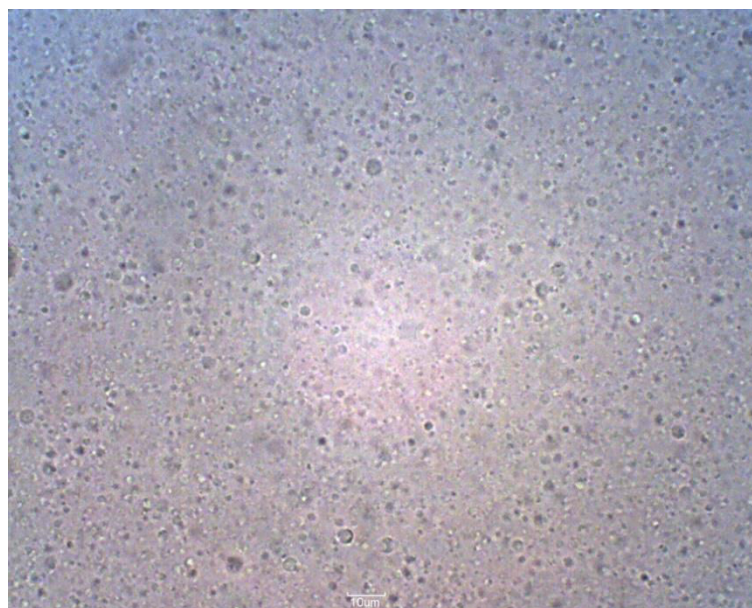
## PARTIE IV : CARACTERISTIQUES DU SYSTEME OPTIMISE

Afin de comparer ce système optimisé au premier système travaillé (2.1), nous l'avons observé au microscope et avons réalisé des mesures granulométriques.

### 1. MICROSCOPIE

L'observation au microscope optique montre la formation de vésicules multilamellaires, nombreuses, homogènes en forme et plutôt hétérogènes en taille.





**Figure 69 : photo au microscope optique (X40) d'une dispersion de capsules optimisées : rapport lipides/G-PG 33 :67, concentration en rutine dans le G-PG: 30 mg/mL.**

## 2. GRANULOMETRIE

Les mesures granulométriques ont été réalisées sur la composition massique optimisée (33 :67), mais contenant 25 mg/mL de rutine. En effet, nous avons souhaité suivre la stabilité du système sur environ un mois. Or, nous avons remarqué que la rutine non encapsulée des dispersions de capsules de concentrations supérieures ou égales à 30 mg de rutine/mL précipitait au bout de quelques jours. Ce phénomène n'étant pas observé à 25 mg/mL, nous avons réalisé le suivi de stabilité à cette concentration.

La distribution de taille de ces capsules à J0 (courbe orange, Figure 70) montre une distribution plutôt homogène entre 52 nm et 1,10 µm avec un pic à 158 nm ainsi que quelques capsules entre 1,905 et 17,38 µm. Nous notons que cette distribution de taille est bien plus petite que celle que nous avons obtenue lors des premiers essais où les deux actifs étaient « encapsulés » simultanément (pic à 479 nm, 3.2).

Les mesures réalisées sur les oignons conservés sous leur forme concentrée (non dispersés) montrent que le système est extrêmement stable (courbe rouge). La distribution est légèrement plus fine, de 52 à 417 nm avec le même pic à 158 nm et quelques capsules entre 1,7 et 17 µm. Ce mode de conservation est donc d'intérêt pour les capsules.

Les mêmes mesures ont été effectuées sur un échantillon conservé 5 semaines sous forme dispersée (à 25 mg/mL d'onions dans l'eau) et nous observons de nouveau que la taille des capsules reste stable (courbe verte). Le nombre de petites capsules tend à augmenter légèrement, ce qui est normal car, sous forme dispersées, les couches supérieures se désagrègent petit à petit, entraînant une libération des actifs et une diminution de la taille des plus grosses capsules.

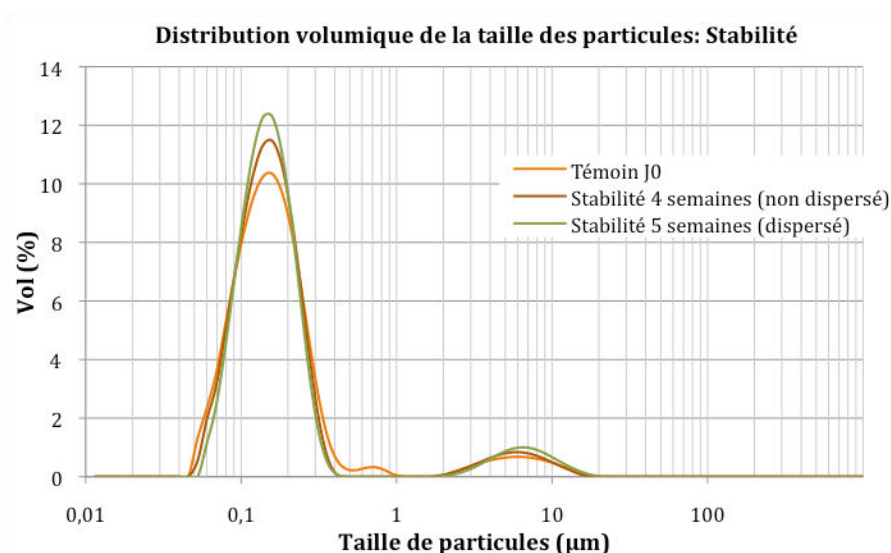


Figure 70 : distribution granulométrique d'oignons de composition lipides/G-PG 33 : 67 contenant 25 mg/mL de rutine à J0 (courbe orange), après 4 semaines conservés sous forme concentrés (courbe rouge) et après 5 semaines conservés sous forme dispersés dans l'eau à 25 mg/mL d'oignons dans l'eau (courbe verte). Tous les échantillons sont conservés à température ambiante.

Ainsi, la stabilité de la taille des capsules est bonne sur environ un mois, quelque soit la forme de conservation testée.

### 3. CINETIQUE DE RELARGAGE

Une cinétique de relargage de la rutine encapsulée à 25 mg/mL dans le système lipides/G-PG 33 : 67 a été engagée afin d'approfondir notre connaissance du système et de réfléchir éventuellement à un mode de conservation des capsules. Nous avons mesuré uniquement les pourcentages d'encapsulation et adsorption. Nous avons étudié en parallèle le comportement du système sous forme dispersé à 25 mg/mL dans l'eau ainsi que conservé sous forme de pâte, c'est à dire non dispersé (la dispersion étant réalisée le jour de l'analyse) (Figure 71).

Nous observons alors que lorsque les capsules sont conservées sous forme dispersée, la rutine fuit linéairement mais assez lentement et qu'au bout de 31 jours, les oignons contiennent encore  $16,0 \pm 0,3$  % de rutine encapsulée et adsorbée. Cette fuite peut être expliquée par les conditions de conservation (température ambiante) ainsi que par l'instabilité des oignons lorsqu'ils sont dispersés dans de l'eau. En effet, les oignons sont connus pour être thermodynamiquement instables et pour revenir à leur structure lamellaire lorsqu'ils sont dispersés sur de longues périodes [178]. Une observation au microscope (Figure 73) a permis de confirmer ces dires car nous y avons observé une diminution visuelle du nombre et de la taille des capsules par rapport à l'observation réalisée à J0, signifiant que la majorité des capsules présentaient alors une taille inférieure au seuil de détection du microscope (environ 300 nm). Cela semble dire que les oignons se détruisent dans le temps. Par contre lorsque les oignons sont conservés sous forme de pâte, c'est-à-dire non dispersés dans l'eau, peu ou pas de fuite n'est détectée. Ainsi la rutine ne fuit que lorsque les oignons se détruisent au contact de l'eau.

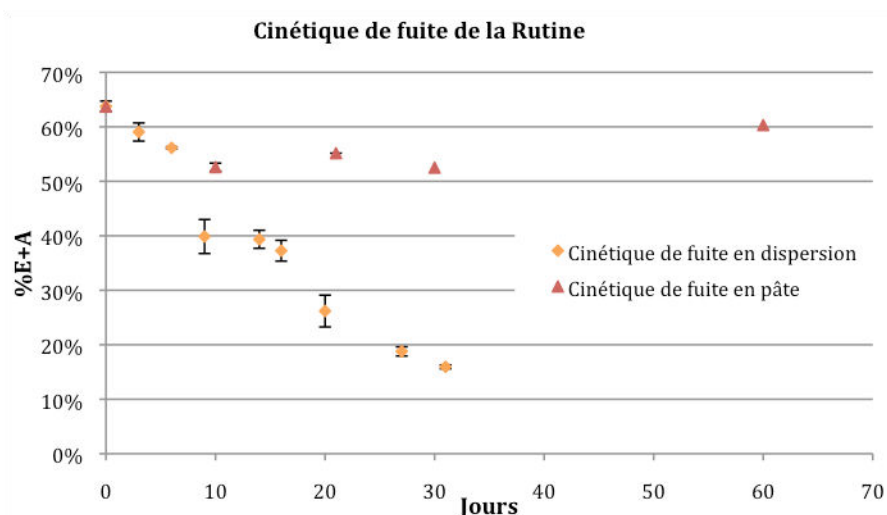


Figure 71 : cinétique de fuite de la rutine encapsulée, en orange - dispersion de capsules dans l'eau à 25 mg/mL, en rouge - capsules conservées sous forme concentrée, à Tamb

Lors des analyses HPLC, nous avons noté un point intéressant concernant la rutine libre, c'est à dire non encapsulée. En effet, nous avons observé qu'après 9 jours de cinétique, un fort pourcentage de quercétine était détecté dans les fractions contenant la rutine libre (Figure 72). Ceci s'explique par une instabilité connue de la rutine dans l'eau, générant de la quercétine par rupture de la liaison C-O entre le sucre (diglycoside) et le groupement flavonol de la rutine (Tableau 49) [244]. Or, de très faibles quantités de quercétine ont été détectées dans les fractions contenant la rutine encapsulée et adsorbée. Ces observations démontrent le potentiel des oignons à protéger la rutine, la faible quantité de quercétine formée provenant vraisemblablement de la rutine adsorbée en surface des oignons.

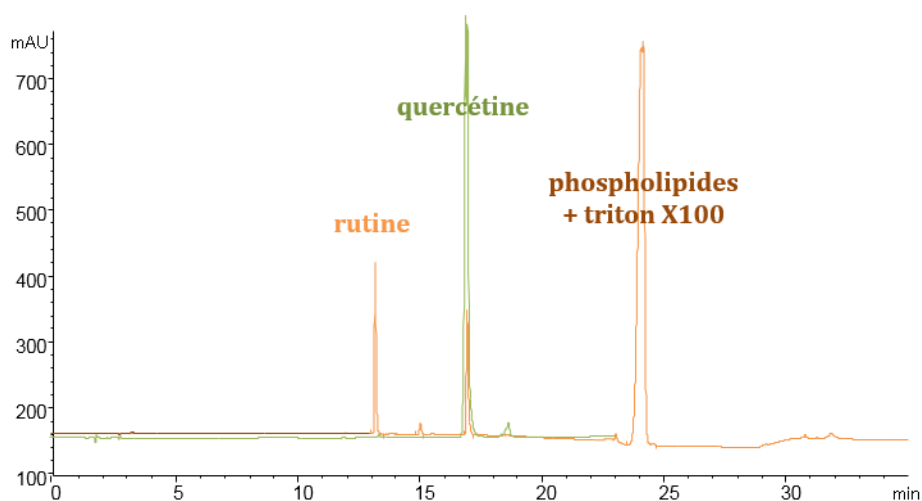
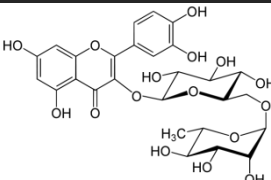
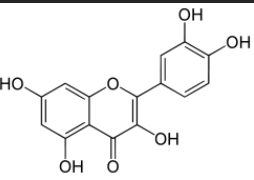
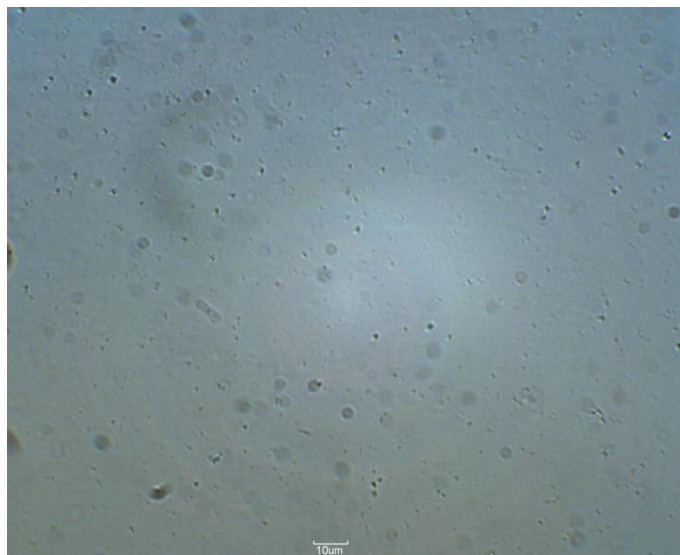


Figure 72 : profils HPLC-UV à 258 nm (en orange) d'une fraction de rutine partiellement dégradée en quercétine et (en vert) d'un standard de quercétine.

**Tableau 49 : structures de la rutine et de la quercétine**

| Composés  | Rutine  | Quercétine   |
|-----------|---|--|
| Structure |  |  |



**Figure 73 : observation au microscope optique (X40) d'une dispersion de capsules lipides/GPG 37 : 63 contenant 25 mg/mL de rutine, dispersées dans l'eau à 25 mg/mL, après 4 semaines conservés à Tamb.**

#### 4. TEST D'ACTIVITE ANTIOXYDANTE

Afin de finaliser l'étude du système encapsulant la rutine, nous avons réalisé un test antioxydant utilisant le radical 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle DPPH•. Ce test est bien adapté pour évaluer le potentiel antioxydant des composés phénoliques. Ces derniers piègent les radicaux libres principalement par transfert d'un atome d'hydrogène vers le DPPH• [245].

L'objectif de cette analyse a été de vérifier que seule la rutine non encapsulée participe à l'activité antioxydante et de valider ainsi la bonne protection de la rutine encapsulée ainsi que la préservation de sa biodisponibilité. De plus, ce test devait nous permettre de savoir si la rutine adsorbée est biodisponible ou non. Les mesures ont été réalisées par spectrophotométrie. En effet, les actifs antioxydants mis en contact avec le radical DPPH• réduisent ce dernier en DPPH. Le radical DPPH•, de couleur violette, devient alors jaune au cours de sa réduction.

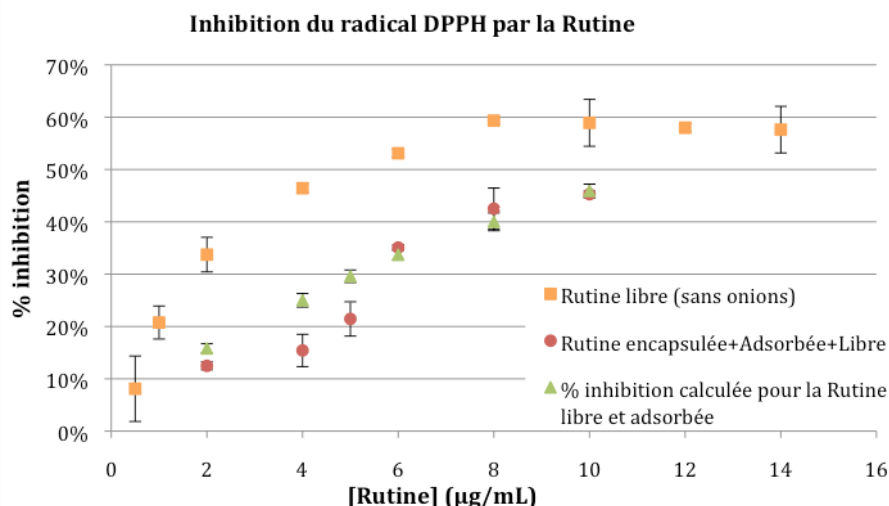


Figure 74 : test d'activité antioxydante au DPPH• pour la rutine libre (carrés oranges) et encapsulée (cercles rouges). Calcul théorique (triangles verts) réalisé à partir de la quantité de rutine libre et adsorbée obtenu à partir du pourcentage mesuré d'encapsulation+ adsorption (62,5 %)

Habituellement, le DPPH• est solubilisé dans du méthanol et l'absorbance UV est suivie à 515-518 nm, absorbances maximales dans ces conditions [246,247]. Dans notre cas, nous ne pouvions solubiliser le réactif dans du méthanol à 100 % car les oignons se dissolvent dans ce solvant. Nous avons pu définir qu'à partir de 15 % de MeOH, les bicouches lamellaires des oignons gonflent (augmentation de l'opacité des échantillons dispersés et validation de l'observation au microscope optique) et qu'en augmentant cette concentration, les oignons sont détruits (diminution de l'opacité jusqu'à l'obtention d'une solution translucide). Nous avons donc fixé la concentration maximale en MeOH à 10 %. Nous avons alors adapté le test à ces conditions en préparant une solution de DPPH• 0,6 mmol dans un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O 75 : 25 v/v alors que les échantillons à tester (rutine libre) ont été préparés en premier lieu dans le G-PG à 25 mg/mL avant d'être dilués dans l'eau. Les échantillons de capsules ont, quant à eux, été directement

dispersés dans l'eau. Le mélange réactionnel est préparé à partir de 0,250 mL de solution de DPPH et 1,750 mL de solution de principe actif, donnant une concentration finale en MeOH de 9,4 %. Dans ces conditions, nous n'avons pas observé de forte absorbance à 517 nm, mais à 700 nm. Nous avons donc réalisé le test à cette longueur d'onde.

La Figure 74 montre le pourcentage d'inhibition du radical DPPH• en fonction de la concentration en rutine. Les essais témoins réalisés à partir de rutine libre, sans capsules, montrent que pour les concentrations en rutine supérieures à 8 µg/mL, l'inhibition atteint un plateau autour de 60 %. Sur la base de ces données qui nous permet de fixer la gamme de concentrations de travail, nous avons réalisé le même test sur de la rutine encapsulée (cercles rouges) : une diminution systématique de l'activité est mesurée, démontrant alors qu'une partie de la rutine n'est pas disponible pour la réaction. Nous avons alors calculé l'inhibition que nous aurions dû obtenir sur la base du pourcentage d'encapsulation et d'adsorption préalablement mesuré (62,5 %) en supposant (i) que la rutine libre et adsorbée participaient à l'inhibition du réactif (triangles vert), (ii) que la rutine adsorbée se comportait comme la rutine libre. Nous sommes donc partis des mesures sur rutine seule (carrés orange) en appliquant le pourcentage préalablement discuté. Nous observons alors que pour la quasi-totalité des essais, le pourcentage d'inhibition mesuré correspond à celui attendu par le calcul. Seules deux concentrations (4 et 5 µg/mL) ont généré des résultats plus faibles que ceux calculés.

Ces résultats démontrent que la rutine encapsulée ne participe pas à l'activité antioxydante, qu'elle est donc bien protégée par le système et que la rutine adsorbée est directement biodisponible. **Ces résultats valident également le modèle mathématique que nous avons développé afin de calculer le pourcentage d'encapsulation.**

**L'ensemble de ces travaux ont conduit à la publication d'un article dans Food Chemistry [248].**

## PARTIE V : CAPSULES OPTIMISEES EN MILIEUX FORMULES

Les capsules de rutine optimisées ont ensuite été incorporées dans quelques formulations cosmétiques et les méthodes d'extraction et de dosage des actifs encapsulés ont été revus suivant les nouvelles contraintes apportées par ces matrices complexes.

### 1. FORMULATION DES CAPSULES EN PRODUITS COSMETIQUES

Dans une première étape, nous avons incorporé des capsules dans les 5 formulations cosmétiques témoins utilisées tout au long de ces travaux de thèse, à savoir une lotion

tonique, un lait émulsionné à froid, un lait émulsionné à chaud, un gel et une crème hydratante (p. 73).

Tout d'abord, plusieurs essais nous ont amené à incorporer les capsules pré-dispersées dans l'eau en fin de formulation, lorsque la température est inférieure à 30 °C. En effet, une température trop élevée risque de les déstructurer voire les détruire. Lors des essais d'incorporation de dispersions de capsules dans le lait émulsionné à froid, nous avons observé une rupture de l'émulsion. Nous pouvons alors aisément conclure à une incompatibilité entre les capsules et le seul agent stabilisant de cette formule qui est un mélange de sodium acrylates copolymer, parraffinum liquidum, PPG-1 trideceth-6. Etant connu que les structures multilamellaires à base de phospholipides peuvent être instables en présence de tensioactifs [200], nous pouvons alors en déduire que l'élément d'interaction dans cette formule est le PPG-1 trideceth-6.

Dans la suite des essais, nous nous sommes alors concentrés sur les 4 autres formulations pour lesquelles aucune modification visuelle et microscopique des formules n'a été observée.

## 2. FRACTIONNEMENT PAR EXCLUSION STERIQUE

Le fractionnement par exclusion stérique de la lotion contenant les capsules a été envisagé de la même manière que les échantillons de capsules dispersées dans l'eau. En effet, cette formule ne contenant pas d'agent rhéologique, sa fluidité rend le traitement de l'échantillon aisé.

Le gel, le lait émulsionné à chaud et la crème contiennent des agents viscosifiants. Leur viscosité élevée ne permet donc pas un fractionnement tel quel. Il a été nécessaire de diluer les échantillons dans l'eau par un facteur 10 afin d'augmenter leur fluidité et de les rendre aptes au fractionnement. Malgré ce traitement, nous ne sommes pas parvenus à fractionner les échantillons. Nous en avons conclu que la présence des polymères hydratés devait freiner le fractionnement sur la phase utilisée (Sephacryl 300HR).

Nous avons alors envisagé une étape supplémentaire de préparation des échantillons de lait et crème. Après dilution par 10, nous les avons centrifugés afin de séparer les phases grasse et aqueuse. Ces deux phases ont alors pu être récupérées séparément. Supposant que les capsules devaient se trouver dans la phase aqueuse (surface externe des oignons composée des têtes polaires des phospholipides), nous avons envisagé le fractionnement de cette phase. Nous sommes alors parvenus à fractionner la phase aqueuse issue de l'échantillon de crème mais pas celle issu de l'échantillon de lait

Sur la base de ces résultats préliminaires de préparation d'échantillons, nous avons envisagé le dosage des actifs libres et encapsulés dans la lotion ainsi que dans la crème.

### 3. DOSAGE DE LA RUTINE ENCAPSULEE PAR HPTLC

Le dosage de la rutine encapsulée dans les produits cosmétiques a été envisagé par HPTLC. En effet, sachant que nous ne pourrions travailler simplement en HPLC avec certaines matrices cosmétiques contenant des composés gras, polymériques, et des tensioactifs, nous avons choisi de réaliser tous les dosages d'actifs incorporés dans les produits cosmétiques à partir de cette technique moins contraignante dans la mise en œuvre.

La rutine étant un standard régulièrement dosé par HPTLC, nous avons utilisé une méthode classique utilisant une phase mobile acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau 100 :11 :11 :26 et une révélation au NP (Natural Product : composé d'acide diphénylboronique aminoéthylester dans de l'acétate d'éthyle) [216]. Le dosage de l'actif est ensuite réalisé à 366 nm. La rutine présente alors un rapport frontal  $R_f$  de 0,30.

Afin de valider la méthode, nous avons tout d'abord dosé des échantillons dont nous connaissions les résultats de dosage par HPLC-UV, à savoir des capsules contenant de la rutine à 25 mg/mL avant puis après fractionnement. Nous avons ainsi pu vérifier que nous dosions  $100,5 \pm 3,37 \%$  de la rutine, démontrant ainsi que la méthode de développement libérait totalement la rutine encapsulée et que le dosage effectué correspondait à la rutine libre, encapsulée et adsorbée. En effet, nous avons déjà observé que l'ajout de solvants organiques et d'acides détruisait les oignons. La phase mobile de développement contenant de l'acétate d'éthyle, de l'acide formique ainsi que de l'acide acétique, les oignons sont détruits par ce mélange. Ce résultat oblige donc à un fractionnement préalable des échantillons avant analyse afin de doser séparément actif libre et actif encapsulé et adsorbé.

Le dosage des fractions de capsules de rutine témoins (non incorporé donc dans une formulation cosmétique) a donné un rendement d'encapsulation (encapsulation et adsorption) de  $67,3 \pm 3,7 \%$  par HPTLC, valeur comparable à celle obtenue par HPLC-UV :  $62,9 \pm 0,3 \%$ .

Nous avons ensuite vérifié que les lipides constituant les vésicules n'interagissaient pas avec le dosage de l'actif en analysant un échantillon de vésicules sans actif (oignons blancs). Les densitogrammes obtenus à 366 nm valident l'absence de co-élution des phospholipides avec la rutine.

L'ensemble de ces données nous ont permis de valider la méthode de dosage de la rutine par HPTLC.



## 4. DOSAGE DE LA RUTINE ENCAPSULEE DANS UNE LOTION

### 4.1 Capsules dans la lotion tonique témoin

Nous avons systématiquement dosé l'échantillon de lotion contenant les capsules avant puis après fractionnement. Nous avons alors constaté une fuite totale de l'actif encapsulé dans la lotion.

Au regard de la composition de la lotion, nous avons alors supposé que le PPG-1-PEG-9 lauryl glycol éther devait augmenter la perméabilité des bicouches lamellaires, entraînant la fuite de la rutine. Ce tensioactif n'a pas détruit les vésicules puisque leur présence est détectable dans les échantillons par augmentation de leur turbidité alors que leur destruction aurait généré un échantillon limpide. Ce composé ayant pour objectif de solubiliser le parfum dans la formule, nous avons envisagé une modification de la formulation par suppression et substitution du tensioactif afin de valider cette hypothèse.

### 4.2 Capsules dans la lotion tonique modifiée

Deux essais ont été engagés. En premier lieu, nous avons totalement supprimé le tensioactif ainsi que le parfum. En second lieu, nous avons substitué le PPG-1-PEG-9 lauryl glycol éther par un tensioactif non-ionique dérivé du sucre, mélange de glucoside caprylique et caprique.

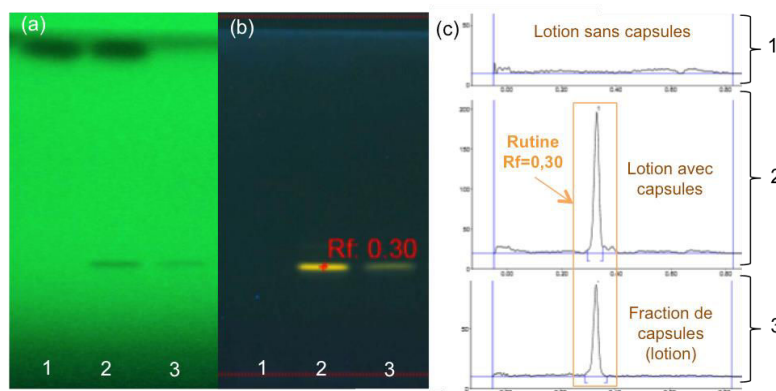


Figure 75 : plaque HPTLC à (a) 254 nm et (b) 366 nm après révélation au NP et (c) densitogrammes associés. Détection de la rutine à  $R_f = 0,3$ . En 1 : échantillon témoin de lotion sans capsules, en 2 : échantillon de lotion contenant les capsules de rutine et en 3 : fraction de capsule obtenue après séparation par SEC.

Dans la formule sans parfum ni tensioactif, nous avons mesuré un rendement d'immobilisation (encapsulation + adsorption) de  $51,4 \pm 0,1 \%$  (Figure 75). Le dosage effectué en parallèle par HPTLC sur les mêmes capsules témoins (capsules non incorporées dans la lotion) fractionnées a donné un rendement de  $54,1 \pm 0,9 \%$ . Ce résultat montre que la quasi-totalité de la rutine reste encapsulée après incorporation dans ce produit.

La formule contenant le parfum et le tensioactif de substitution a montré que la rutine restait bien encapsulée, avec une légère fuite puisque nous avons obtenu  $42,5 \pm 3,1$  % d'encapsulation.

Nous pouvons ainsi conclure que c'est bien le tensioactif qui était à l'origine de la fuite de la rutine à travers les capsules et que la substitution s'est montrée bénéfique avec un très bon résultat d'encapsulation après incorporation dans la lotion.

## 5. DOSAGE DE LA RUTINE ENCAPSULEE DANS UNE CREME

Tous les échantillons issus du fractionnement des échantillons de crème contenant la rutine libre et/ou encapsulée ont été analysés par HPTLC. En effet, la présence de composés gras dans la matrice ne permet pas une analyse simple par HPLC.

Le dosage de la crème contenant les capsules à 40 mg/mL dilué par 10 (concentration finale en capsule équivalente à 4 mg/mL) permet de vérifier que nous dosons bien la totalité de la rutine incorporée ( $94,1 \pm 7,6$  %).

Puis nous avons dosé la rutine présente dans les phases grasse et aqueuse après centrifugation et avons noté que nous récupérons  $46,5 \pm 1,5$  % de la rutine dans la phase aqueuse et  $50,6 \pm 2,0$  % dans la phase grasse.

La phase grasse étant trop visqueuse pour être analysée telle quelle, nous avons ajouté une étape d'extraction au méthanol afin de récupérer la rutine à doser. Cette méthode a été validée par l'ajout d'une quantité connue de rutine dans la phase grasse. L'extraction de ces échantillons témoins a permis de vérifier que nous récupérons  $103,4 \pm 3,9$  % de rutine.

La surface externe des oignons étant polaire, il est peu probable qu'il s'en trouve dans la phase grasse. Nous pouvons donc penser que la rutine dosée dans cette phase correspond à de la rutine libre.

Nous avons alors fractionné la phase aqueuse et avons pu constater que les capsules récupérées contiennent encore de la rutine encapsulée. Le calcul du rendement d'encapsulation après incorporation dans la crème est alors de  $27,3 \pm 3,2$  % sur la totalité de l'échantillon (en supposant l'absence de capsules dans la phase grasse).

Ce résultat montre qu'environ 50 % de la rutine fuit lors de l'incorporation des capsules dans la crème.

Ce résultat est très encourageant et montre qu'il est possible d'incorporer des actifs encapsulés dans des matrices très complexes. Il serait alors intéressant d'élargir ces essais à d'autres matrices et surtout de développer des formules cosmétiques limitant au maximum la fuite de l'actif. Enfin, l'étape suivante serait de suivre la cinétique de fuite de l'actif dans le produit et de corrélérer ces résultats avec l'activité revendiquée.

## 6. CONCLUSION

Ainsi, nous avons pu **développer une méthode de préparation d'échantillon et de dosage d'actif encapsulé après incorporation dans des produits cosmétiques**. Grâce à ces méthodes, il devient possible de **suivre l'évolution des capsules dans le temps** et d'appliquer éventuellement des **conditions de stockage adaptées suivant la vitesse de fuite** observée. Il devient également possible d'**améliorer ou d'adapter les formulations** en fonction des observations d'incompatibilités détectées.

## PARTIE VI : APPLICATION DU SYSTEME A D'AUTRES MOLECULES

A partir des résultats obtenus pour l'encapsulation de la rutine dans les oignons, nous avons souhaité élargir les essais d'encapsulation à d'autres molécules afin de comparer les rendements obtenus en fonction de la nature des actifs. Afin de définir des molécules en adéquation avec ces travaux, nous avons orienté notre choix vers des actifs aux propriétés conservatrices :

- Acide benzoïque
- Acide salicylique
- Méthylisothiazolinone/Méthylchloroisothiazolinone
- Chlorhexidine

**Tableau 50 : caractérisation du fractionnement des actifs avec et sans oignons, avec la Sephacryl 300HR**

|  | Volume d'élution (mL)   | Recouvrement<br>oignons/actif libre | % actif dosé<br>après<br>fractionnement |
|--|---|-------------------------------------|---|
| Acide benzoïque                          | 5-15  | <b>Oui</b>                          | 95,5 ± 5,5 %                            |
| Oignons contenant<br>l'acide benzoïque   | 1,5-6   |                                     |   |
| Acide salicylique                        | 6-16  | <b>Possible</b>                     | 90,0 %                                  |
| Oignons contenant<br>l'acide salicylique | 1,5-6   |                                     |   |
| MCI/MI                                   | 3,2-6,6   | <b>Oui</b>                          | -                                       |
| Oignons contenant<br>MCI/MI              | 1,4-6,8   |                                     |   |
| Chlorhexidine                            | 4-9 puis en faibles<br>concentrations au delà de<br>10 mL (traces toujours<br>présentes au delà de 50 mL) | <b>Oui</b>                          | 88,5 ± 1,6 %                            |
| Oignons contenant<br>Chlorhexidine       | 1,5-6   |                                     |   |

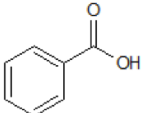
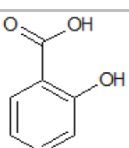
Comme pour la rutine et la naringénine, pour chaque analyte testé, les profils d'élution ont été définis par fractionnement de solutions d'actifs sans oignons. Ces résultats ont été comparés au volume d'élution de la fraction d'oignons contenant l'actif étudié pour définir si un recouvrement pouvait avoir lieu et empêcher la séparation capsules/actifs libres (Tableau 50). Nous observons alors un recouvrement partiel systématique. Forts de ces observations, nous avons donc récupéré les premières fractions d'oignons, celles ne présentant pas de recouvrement avec les actifs libres.

## 1. ACIDES BENZOÏQUE ET SALYCILIQUE

Dans un premier temps, nous avons choisi les acides benzoïque et salicylique (Tableau 51) qui sont deux conservateurs autorisés par COSMOS-Standard. De plus, la plante C contient de l'acide benzoïque. Aussi, si les rendements d'encapsulation de cet analyte pur sont positifs, il sera intéressant de transposer l'encapsulation à cet extrait et de doser l'actif retenu par le système.

Connaissant la solubilité de ces actifs dans l'eau, nous avons préparé des solutions contenant 2,8 mg/mL d'acide benzoïque dans l'eau d'une part, et dans le G-PG d'autre part, ainsi que 2,0 mg/mL d'acide salicylique dans l'eau d'une part, et dans le G-PG d'autre part. Le dosage des actifs a été réalisé par HPLC-UV à 230 nm pour l'acide benzoïque et à 234 nm pour l'acide salicylique (Figure 76). A partir des résultats obtenus avec la rutine, nous avons décidé de tester deux compositions massiques lipides/phase hydrophile pour chaque actif : 55 : 45 et 33 : 67.

Tableau 51 : caractéristiques des acides benzoïque et salicylique

| Composés          | Structure   | M (g/mol) | Solubilité dans l'eau (g/L) à 20°C | Réf   |
|-------------------|---|-----------|------------------------------------|-------|
| Acide benzoïque   |  | 122,12    | 2,9 (faiblement soluble)           | [249] |
| Acide salicylique |  | 138,12    | 2,0-2,2 (faiblement soluble)       | [250] |

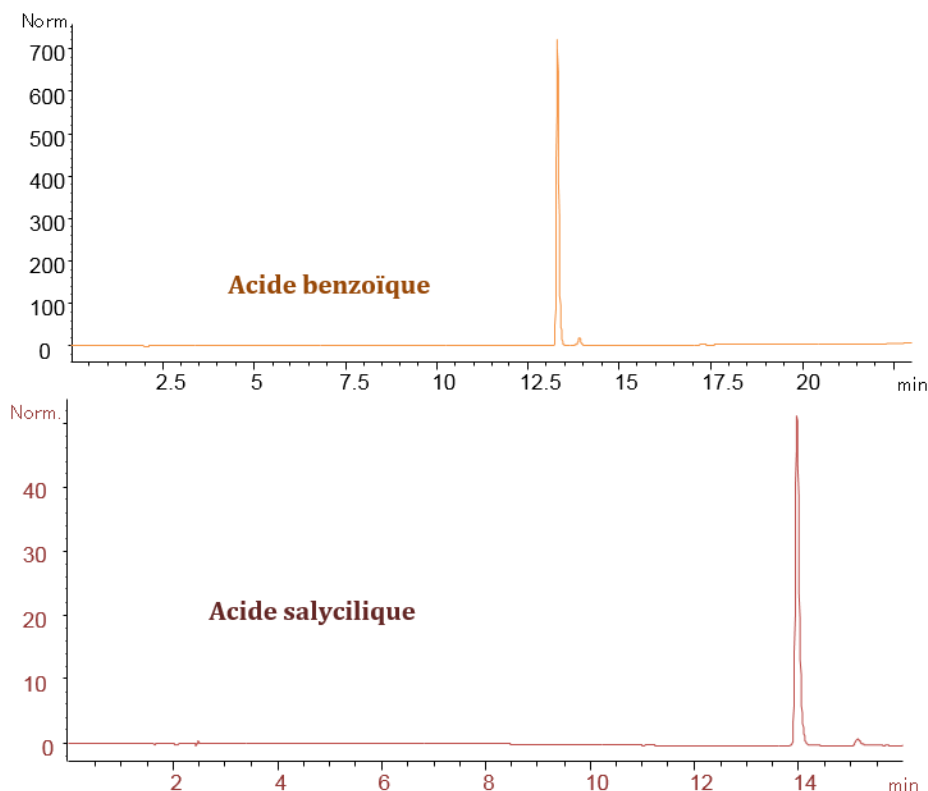


Figure 76 : profils HPLC-UV des acides benzoïque (230 nm) et salicylique (234 nm).

## 1.1 Microscopie

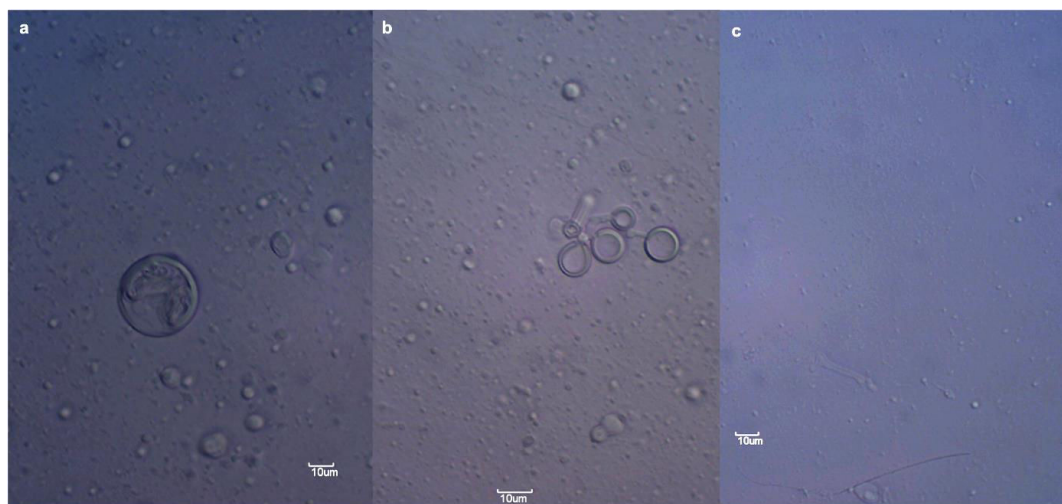


Figure 77 : photos au microscope optique de dispersions de vésicules de composition (a) et (b) lipide/eau 55 : 45, l'eau contenant 2,8 mg/mL d'acide benzoïque et (c) lipide/G-PG 55 45, le G-PG contenant 2,8 mg/mL d'acide benzoïque

Les observations au microscope optique de capsules d'acide benzoïque (acide dans l'eau) ont montré des tailles de particules hétérogènes, mélanges d'oignons (points les plus foncés) et de vésicules uni- ou multilamellaires « classiques » (formes les plus claires, pour lesquels nous observons distinctement les bicouches) (Figure 77 (a) et (b)).

Lorsque l'actif est solubilisé dans le G-PG (Figure 77 (c)), les capsules sont beaucoup plus petites, plutôt claires, à la limite de résolution du microscope.

## 1.2 Rendements d'encapsulation

Comme montré dans le Tableau 51, une possibilité de recouvrement entre la fraction d'oignons et les actifs est envisageable avec la Sephacryl HR300. Nous avons donc également testé la Sephadex G10. Néanmoins, le volume d'élution avec cette phase est de 4,0 à 7,5 mL pour les deux acides. Le recouvrement est donc plus important qu'avec la Sephacryl. Dans une première phase d'essai où nous avons simplement souhaité évaluer l'encapsulation de manière qualitative, nous avons donc réalisé les essais avec la Sephacryl. En effet, il nous a suffi de récupérer la fraction d'oignons en 3 fois, la co-élution entre les oignons et les actifs non encapsulés n'étant envisageable que dans la troisième fraction. Cette méthode assure l'absence d'acide libre dans les fractions 1 et 2, la fraction 1 étant la plus concentrée en oignons. Aussi, notre premier objectif a été de vérifier si nous encapsulions les acides, sans pour autant les doser.

Quelle que soit la composition des capsules et la nature de l'acide, nous avons alors observé que nous n'avions ni d'encapsulation ni d'adsorption.

Suite à ces résultats, nous avons alors pensé que nous devrions acidifier l'eau utilisée pour disperser les capsules ainsi que l'eau utilisée lors du fractionnement. En effet, bien que la solution aqueuse d'acide benzoïque encapsulée présente un pH de 3-4 ( $pK_a = 4,2$ ), nous avons envisagé que le fractionnement avec l'eau distillée de pH non acidifié pouvait entraîner une dissociation partielle de l'acide avec une éventuelle rétention de la forme benzoate sur la phase et/ou une modification des rendements d'encapsulation. Après avoir vérifié que le pH n'influait pas le dosage HPLC-UV de l'acide, nous avons pu conclure que l'actif n'était pas encapsulé, quelque soit la composition des capsules.

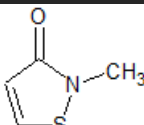
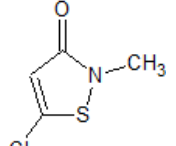
Sur la base de ses résultats, nous pouvons conclure que les molécules sont trop petites pour être retenues dans les membranes avec des forces d'interactions trop faibles pour empêcher leur fuite. En effet, des acides gras ont déjà été encapsulés dans les oignons à la condition que la chaîne aliphatique soit suffisamment longue [193]. La partie hydrophobe de nos acides doit donc être trop petite pour que les molécules soient retenues entre les bicouches. Elles diffusent alors à travers les membranes phospholipidiques.

## 2. METHYLISOTHIAZOLINONE ET METHYLCHLOROISOTHIAZOLINONE (MI/MCI)

Afin de compléter notre compréhension du système d'encapsulation membranaire développé, nous avons choisi d'encapsuler deux autres petites molécules, mais de fonctions chimiques différentes des acides précédemment étudiés : les méthylisothiazolinone (MI) et méthylchloroisothiazolinone (MCI) (Tableau 52). La solution utilisée est un mélange déjà prédéfini contenant 0,37 % de MI et 1,13 % de MCI

dans l'eau. C'est cette solution qui a été encapsulée. Nous noterons que la solution contient également 23 % de sels de magnésium (chlorure et nitrate).

**Tableau 52 : caractéristiques des méthylisothiazolinone et méthylchloroizothiazolinone**

| Composés                           | Structure  | M (g/mol) |
|------------------------------------|--|-----------|
| <b>Méthylisothiazolinone</b>       |   | 115,15    |
| <b>Méthylchloroizothiazolinone</b> |  | 138,12    |

Les essais d'encapsulation ont seulement été réalisés sur un système de composition lipide/eau 55 : 45.

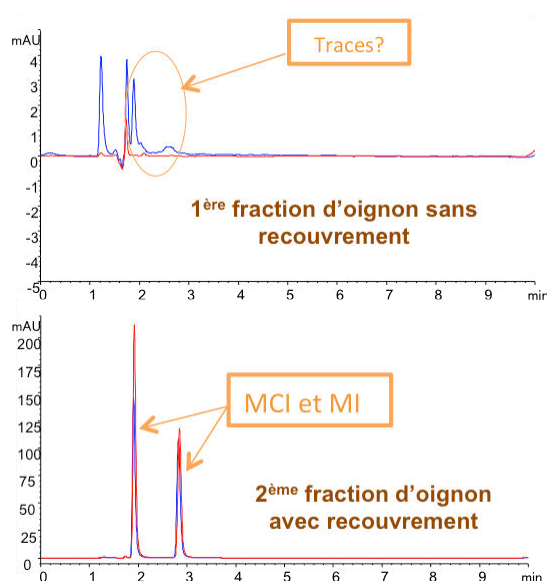
## 2.1 Microscopie

Les observations au microscope optique sont difficiles à interpréter (Figure 78). Nous visualisons une très forte agglomération des particules formées. La présence de sel dans la solution (23 % de sels de magnésium) peut expliquer ce phénomène. Des oignons sont donc très vraisemblablement formés en très grande quantité, sous forme d'aggrégats.



**Figure 78 : photos au microscope optique de dispersions de vésicules de composition lipides/solution aqueuse 55 : 45, la solution aqueuse contenant les MCI et MI à 1,13 et 0,37 % respectivement**

## 2.2 Rendements d'encapsulation



**Figure 79 : profils HPLC-UV (en haut) de la première fraction d'oignons détruite par TX-100 dans laquelle seules des traces de MCI/MI sont détectées et (en bas) de la deuxième fraction d'oignons dans laquelle les actifs sont fortement présents. En rouge les profils HPLC-UV du fractionnement témoin des actifs non encapsulés, en bleu les profils HPLC-UV des actifs encapsulés.**

De même que pour les acides, nous avons observé un fort recouvrement de la fraction d'oignons et des actifs libres. Sur le même modèle que les acides, nous avons récupéré la fraction d'oignons en 3 fois. Comme le montrent les profils HPLC-UV Figure 79, nous avons alors observé que dans la première fraction fortement concentrée en oignons, seules des traces des actifs étaient présentes alors que dans la deuxième fraction plus faiblement concentrée en oignons, les deux actifs sont présents à très haute dose. Ayant réalisé en parallèle un fractionnement identique des deux actifs non encapsulés, la superposition des profils UV nous a permis de conclure que les deux actifs n'étaient pas encapsulés par le système.

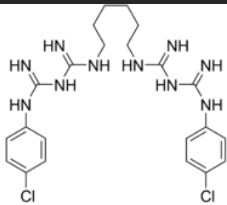
Nous avons alors conclu que le système membranaire phospholipidique ne permettait pas l'encapsulation des MI et MCI ainsi que des acides précédents, molécules au poids moléculaire trop faible pour être retenues.

## 3. CHLORHEXIDINE

Dans une dernière perspective d'encapsulation d'actif conservateur, nous avons sélectionné la chlorhexidine, de poids moléculaire supérieur aux actifs précédents. La solution mère que nous avons utilisée est une solution de chlorhexidine digluconate à 20 % dans l'eau (Tableau 53).



Tableau 53 : caractéristiques de la chlorhexidine

| Composés      | Structure  | M (g/mol) |
|---------------|--|-----------|
| Chlorhexidine |  | 505,45    |

### 3.1 Microscopie

Les observations au microscope optique des capsules de chlorhexidine digluconate montrent une distribution d'oignons de taille relativement homogène.



Figure 80 : photos au microscope optique X40 de dispersions de capsules d'oignons de composition lipides/solution aqueuse 55 : 45, la solution aqueuse contenant la chlorhexidine à 20 % (en masse).

### 3.2 Rendements d'encapsulation

La mise au point de la méthode HPLC-UV pour la chlorhexidine selon la même méthode que pour la rutine montre que les deux actifs ont un temps de rétention proche. En effet, la rutine élue à 13 min et la chlorhexidine à 14,5 min (Figure 81). Il sera donc intéressant de comparer les rendements d'encapsulation des deux molécules.

Dans un premier temps, nous avons encapsulé la solution mère sans dilution dans les systèmes lipides/solution mère 55 : 45 et 33 : 67. Nous avons alors obtenu des rendements d'encapsulation et adsorption  $\%_{E+A}$  de  $30,9 \pm 2,3 \%$  pour le premier système et de  $36,9 \pm 4,1 \%$  pour le deuxième. Ainsi, comme pour la rutine, nous observons de meilleurs rendements lorsque le pourcentage en lipides est de 33 % dans le système. Afin d'évaluer le rendement réel d'encapsulation, nous avons donc testé le potentiel d'adsorption de cette nouvelle molécule en surface des oignons pour le système optimisé. Nous avons alors mesuré que seul  $1,7 \pm 0,3 \%$  de la chlorhexidine s'adsorbe, ce qui nous a permis de calculer un rendement d'encapsulation  $\%_E$  de  $35,8 \pm 7,3 \%$ .

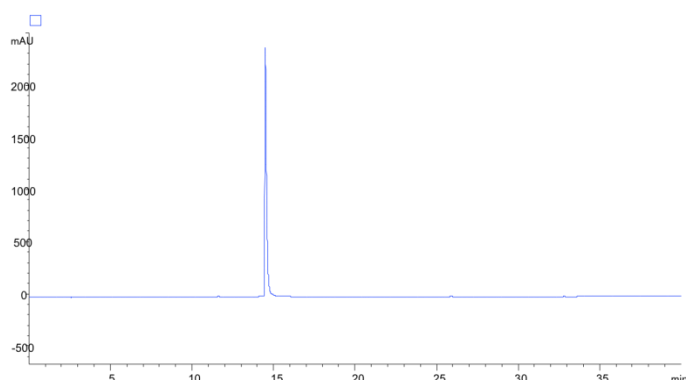
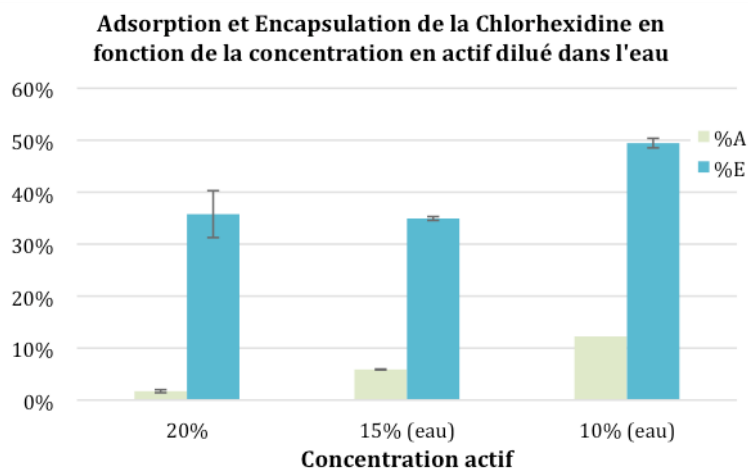


Figure 81 : profil HPLC-UV de la chlorhexidine a 258 nm

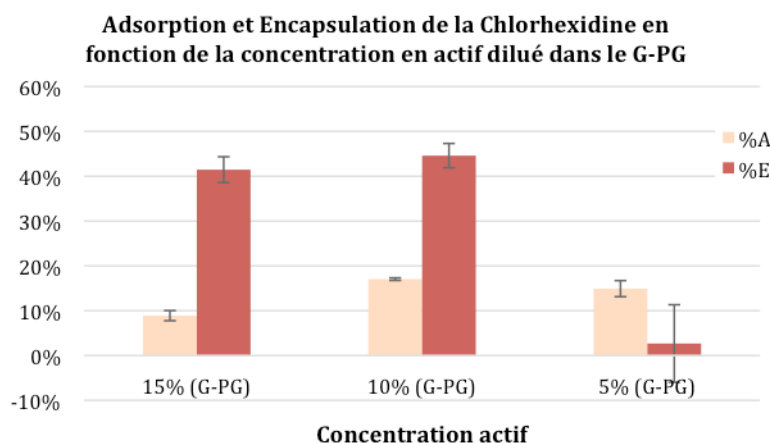
Le phénomène d'adsorption est faible par comparaison avec celui observé pour la rutine. Cela peut s'expliquer par la différence de polarité des deux molécules. En effet, la chlorhexidine, beaucoup plus polaire que la rutine, se distribuera préférentiellement dans le milieu dispersant (l'eau) alors que la rutine s'adsorbera majoritairement en surface des capsules. Nous avons également pensé que la nature de la phase solubilisant l'actif pouvait influencer sur les interactions entre celui-ci et les membranes lipidiques. Nous avons alors dilué la solution mère de chlorhexidine à 15 et 10 % dans l'eau d'une part, et dans le G-PG d'autre part. Des essais d'encapsulation et adsorption ont alors été engagés avec le système lipides/phase hydrophile 33 : 67.

Les essais réalisés par dilution de la solution mère dans l'eau montrent que plus le pourcentage en chlorhexidine diminue, plus le rendement d'adsorption augmente, pour atteindre 12,3 % lorsque la solution contient 10 % d'actif (Figure 82). Malgré ce résultat, le pourcentage d'encapsulation tend à augmenter, notamment lorsque la concentration en actif est abaissée à 10 %. Nous obtenons alors un rendement de  $49,5 \pm 0,9$  % d'encapsulation. Ceci tend à montrer que nous sommes dans la partie diphasique du diagramme de phase (co-existence entre une phase lamellaire contenant de l'actif et d'une phase d'actif en excès) lorsque la concentration en actif est importante (voir partie III, section 3.2).

Lorsque nous avons remplacé le solvant de dilution par le G-PG pour obtenir des concentrations en actif de 15, 10 et 5 %, nous avons alors noté que le pourcentage d'adsorption tend également à augmenter lorsque la concentration en chlorhexidine diminue pour se stabiliser autour de 16 % en moyenne (Figure 83). Par comparaison avec les essais réalisés dans l'eau, l'adsorption est systématiquement plus importante lorsque du G-PG est incorporé. Ces résultats paraissent valider l'hypothèse selon laquelle la nature du solvant de dilution de l'actif influe sur les interactions actif-membranes. La présence des fonctions hydroxyles sur la glycérine et le propylène glycol, composés de la matrice G-PG, doit être à l'origine de ces différences. En effet, les fonctions hydroxyles peuvent créer des liaisons hydrogènes avec l'actif ainsi qu'avec les phospholipides augmentant alors la rétention en surface des oignons.



**Figure 82 : rendements d'adsorption et d'encapsulation de la chlorhexidine dans le système lipides/phase hydrophile 33 : 67, pour différentes concentration en actif dans l'eau.**



**Figure 83 : rendements d'adsorption et d'encapsulation de la chlorhexidine dans le système lipides/phase hydrophile 33 : 67, pour différentes concentration en actif, la solution mère aqueuse étant diluée dans le G-PG.**

Le pourcentage d'encapsulation maximal obtenu pour la solution à 10 % d'actif est alors de  $44,6 \pm 2,7$  %. Ce résultat est inférieur à celui obtenu avec l'eau. Cette différence est dû à l'adsorption car les pourcentages d'encapsulation et adsorption pour les deux systèmes sont équivalents, avec un  $\%_{E+A}$  de  $55,6 \pm 0,8$  % lorsque le solvant est de l'eau et  $\%_{E+A}$  de  $54,0 \pm 2,0$  % lorsque le solvant est le G-PG.

De manière surprenante, nous observons que lorsque la concentration en chlorhexidine est abaissée à 5 %, le rendement d'encapsulation chute à  $2,7 \pm 8,7$  %

Il apparaît donc clairement que nous pourrions appliquer le modèle développé pour la routine afin de définir la concentration optimale en chlorhexidine à encapsuler ainsi que la composition massique optimale des oignons. Notre objectif lors de ces essais étant simplement de vérifier la possibilité d'encapsuler un autre actif, nous n'avons pas réalisé cette optimisation.

Cette étude rapide met en évidence plusieurs perspectives. En effet, nous avons observé une influence de la nature du solvant de dilution de l'actif sur les phénomènes de rétention dans les oignons. A 10 %, des résultats similaires ont été observés dans l'eau et

dans le G-PG. Afin de sélectionner le système le plus performant, il serait intéressant de poursuivre avec une cinétique de fuite de l'actif. Enfin, l'application des modèles mathématiques développés pour la routine à ce nouvel actif serait une bonne perspective d'approfondissement.

## **PARTIE VII : ENCAPSULATION DE L'EXTRAIT DE PLANTE A**

Dans une dernière étape de ces travaux, le système d'encapsulation été appliqué à l'extrait de plante A. Plusieurs support liquides ayant été testés tout au long des essais d'optimisation de l'extrait (chapitre II, sections 1.2 et 1.4), nous avons tout d'abord étudié l'influence de ces supports sur la formulation d'oignons par analyse microscopique. L'actif d'intérêt de la plante étant connu et facilement dosable, la mesure du rendement d'encapsulation de cet actif pouvait dès lors se faire.

### **1. OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES**

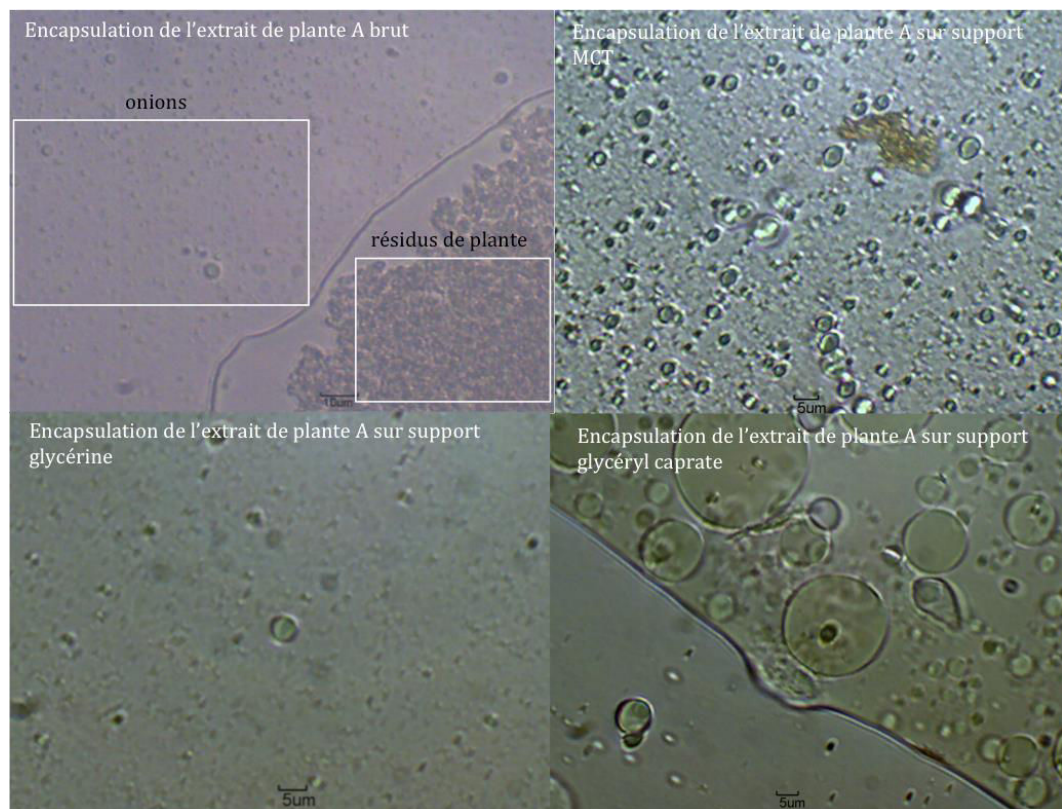
Les supports liquides sont les suivants :

- Ethylhexylglycérine
- Glycéryl caprate
- Caprylyl glycol
- Capryloyl glycine
- Glycéryl caprylate
- Glycérine
- Propylène glycol
- Butylène glycol
- Propanediol
- Ethylhexylglycérine/caprylyl glycol
- TCM (Triglycérides à chaînes moyennes)

A cette liste s'ajoute l'encapsulation de l'extrait pilote MeOH brut encapsulé tel quel puis avec le mélange G-PG. Tout les essais ont été réalisés avec le système optimisé, composé de 33 % de lipide et de 67 % d'extrait sur support ou brut. Les extraits sur supports sont composés d'environ 50 % d'extrait et 50 % de support, à l'exception de l'extrait sur support TCM. Nous ne connaissons pas la quantité de support TCM présente pour cet extrait, mais elle est estimée à plus de 90 %. Nous avons systématiquement observé que des résidus d'extraits étaient présents dans les dispersions des vésicules supposées. Ceci s'est traduit par un phénomène de précipitation de l'extrait non encapsulé dans l'eau, au moment de la dispersion des capsules (25 mg/mL de capsules dans l'eau). Ces résidus sont clairement visibles au microscope, comme le montrent les exemples exposés Figure 84. Pour la majorité des essais, la formation d'oignons n'a pas été observée. Certaines formulations ont montré la formation de vésicules de tailles variées. Seuls les essais d'encapsulation de l'extrait brut, de l'extrait sur support TCM et éventuellement glycérine nous ont paru former des oignons. Le Nous noterons néanmoins que des essais

complémentaires seraient à envisager. En particulier, il serait nécessaire d'observer au microscope les extraits sur support non encapsulés, ainsi que des capsules formulées avec les supports sans l'extrait de plante.

Tableau 54 résume les observations.



**Figure 84 : observation au microscope optique de dispersion de capsules d'extrait de plante A brut, sur support TCM, glycérine et glycéryl caprate.**

Suite à ces observations, nous avons alors sélectionné les formules les plus prometteuses, à savoir l'encapsulation de l'extrait brut et de l'extrait sur support TCM.

Nous noterons néanmoins que des essais complémentaires seraient à envisager. En particulier, il serait nécessaire d'observer au microscope les extraits sur support non encapsulés, ainsi que des capsules formulées avec les supports sans l'extrait de plante.

**Tableau 54 : résultats des observations au microscope optique des essais d'encapsulation de la plante A**

| Matière encapsulée  | Observation microscopique           |
|---------------------|-------------------------------------|
| Ethylhexylglycérine | Pas de capsules                     |
| Glycéryl caprate    | Des vésicules unilamellaires        |
| Caprylyl glycol     | Pas de capsules                     |
| Capryloyl glycine   | Pas de capsules                     |
| Glycéryl caprylate  | Pas de capsules                     |
| Glycérine           | Oignons et vésicules unilamellaires |

| Matière encapsulée                  | Observation microscopique                      |
|-------------------------------------|--|
|                                     | Peu nombreux                                   |
| Propylène glycol                    | Très rares vésicules unilamellaires            |
| Butylène glycol                     | Très rares oignons ou vésicules unilamellaires |
| Propanediol                         | Très rares oignons ou vésicules unilamellaires |
| Ethylhexylglycérine/caprylyl glycol | Très rares vésicules unilamellaires            |
| TCM                                 | Nombreux oignons et vésicules unilamellaires   |
| Extrait brut                        | Nombreux oignons                               |
| Extrait brut + G-PG                 | Pas de capsules                                |

## 2. RENDEMENTS D'ENCAPSULATION

L'analyse des échantillons de capsules contenant l'extrait de plante A a été réalisée par HPTLC. Avant de pouvoir entreprendre le fractionnement des échantillons dispersés de capsules de plante A, nous avons été confrontés au problème de précipitation de l'extrait non encapsulé dans l'eau. Nous avons alors procédé à une première étape de filtration sur des filtres en cellulose de 10-20  $\mu\text{m}$ . Des résidus précipités étant encore présents dans le filtrat (filtrat contenant également les oignons), nous avons réduit la taille du filtre (cellulose) à 5-8  $\mu\text{m}$  et avons réalisé deux filtrations successives avec succès. Nous avons ainsi récupéré le filtrat contenant les oignons, tout en ayant éliminé les résidus d'extrait précipités.

Les échantillons de capsules filtrés ont alors été fractionnés. Seulement, aucune fraction d'oignons n'a été élue. Cette méthode de préparation d'échantillon s'est donc avérée inadaptée dans ce cas particulier. Le même résultat a d'ailleurs été obtenu par fractionnement des capsules formulées à partir de l'extrait brut. Nous pouvons supposer que la présence de certaines molécules en surface des oignons pourrait générer leur rétention sur la phase d'exclusion (Sephacryl).

Nous avons alors modifié la technique de préparation des échantillons. En effet, nous avons supposé que la totalité de l'actif non encapsulé et donc dispersé dans l'eau pouvait précipiter. Dans ce cas, la filtration pourrait suffire à retenir cet actif libre, alors que les capsules récupérées ne contiendraient que l'actif encapsulé. Le dosage direct du filtrat après destruction des vésicules par TX-100 donnerait alors le rendement d'encapsulation.

Afin de valider cette hypothèse, des échantillons contenant l'extrait de plante A pilote EtOH/H<sub>2</sub>O décoloré par distillation moléculaire sur support TCM ont été préparés dans l'eau puis filtrés. Le filtrat a alors été dosé. Les analyses ont montré que l'actif était présent dans le filtrat, mais en quantité négligeable. En effet, nous n'avons dosé que  $0,77 \pm 0,24$  % de l'actif dans la solution filtrée. Nous avons donc validé la méthode. Les calculs de rendements d'encapsulation de l'actif de la plante A ont alors été réalisés par dosage des solutions de vésicules traitées par TX-100, avant et après filtration.

Les rendements d'encapsulation mesurés sont de  $89,1 \pm 2,4$  %. Ce résultat constitue le meilleur rendement d'encapsulation obtenu au cours de ces travaux. Nous avons

souhaité le comparer avec l'encapsulation d'un autre extrait sur support TCM également, mais non décoloré et obtenu à l'échelle laboratoire. Nous avons alors mesuré un rendement d'encapsulation beaucoup plus faible, de  $11,4 \pm 2,8 \%$ . Ces résultats sont très intéressants et montrent que, quelque soit l'extrait testé à l'encapsulation, l'actif présente une forte affinité pour les membranes des oignons. En effet, l'extrait de plante A est constitué de centaines de molécules, ce qui augmente la sélectivité à l'encapsulation, réduisant les possibilités de hauts rendements. La décoloration réduisant le nombre de molécules présentes, nous pouvons supposer que nous augmentons la charge en molécules restantes, dont l'actif. Nous notons que nous avons pu formuler ces oignons sans phase aqueuse puisque le support est constitué de triglycérides. Bien que l'hydratation des phospholipides se soit avérée plus longue, le concentré final d'oignons est homogène et fluide. La nature de ce support ainsi que la faible polarité de l'extrait nous permettent de supposer qu'il est retenu par les chaînes hydrophobes des phospholipides.

L'étape suivante sera de tester l'encapsulation de l'extrait antimicrobien validé pour son utilisation cosmétique.

## PARTIE VIII : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ces travaux d'encapsulation d'actifs et d'extrait naturel ont montré les perspectives offertes par les systèmes à base de phospholipides tout en faisant ressortir les limites. Nous avons encapsulé avec succès un flavonol glycosylé (rutine) à hauteur de 62,5 % et avons montré un phénomène d'adsorption de l'actif en surface des oignons à hauteur de 15 à 20 %. Le flavonone étudié (naringénine) a révélé un comportement différent, avec une adsorption systématique très élevée (environ 70 %) sans être pour autant encapsulé. Nous pouvons dès lors conclure à une sélection du système pour ce qui est de l'encapsulation des flavonoïdes.

Des modèles mathématiques ont par ailleurs permis d'optimiser la composition des oignons.

Nos résultats ont montré que le système ne permettait pas d'encapsuler les molécules de faible poids moléculaire ( $< 140 \text{ g/mol}$ ), soit par manque d'affinité avec les phospholipides, soit à cause d'une fuite trop rapide lors de la dispersion des oignons dans l'eau.

La possibilité d'encapsuler la chlorhexidine de plus haut poids moléculaire semble confirmer ces observations.

Enfin, nous avons pu appliquer le système à l'encapsulation de l'extrait de plante A sur support TCM avec succès. L'actif y est en effet retenu à hauteur de  $89,1 \pm 2,1 \%$ , ce qui constitue le meilleur rendement obtenu au cours de nos travaux. Ces résultats sont très prometteurs et après une validation de ces rendements d'encapsulation sur l'extrait de

plante finalisé pour la commercialisation, la dernière étape sera d'évaluer l'impact du système sur la protection antimicrobienne des produits cosmétiques.







## CHAPITRE IV

### MATERIEL ET METHODES



## **PARTIE I : FORMULATION COSMETIQUE**

### **1. OPTIMISATION DE FORMULATIONS COSMETIQUES PAR DIMINUTION DE L'ACTIVITE DE L'EAU**

#### **1.2. Aw-mètre**

Les mesures d'activité de l'eau sont réalisées avec un  $a_w$ -mètre Labswift-aw (Novasina, Suisse). L'appareillage possède une plage de mesure de l' $a_w$  s'étendant de 0,030 à  $1,000 \pm 0,010$ , sur une gamme de température d'échantillon de 5 à 45 °C.

Afin de réaliser l'analyse, l'échantillon est introduit dans une coupelle en polypropylène déposée dans une enceinte étanche de l'appareillage. L'eau libre humidifie ou assèche l'air à l'intérieur de la chambre jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint. La mesure d'humidité relative est réalisée à l'aide d'un capteur électrolytique puis la valeur est convertie en  $a_w$ . La température est contrôlée par infrarouge. Lorsque la mesure est stable sur une durée de 2 min conformément aux conditions de mesures que nous avons choisies, la mesure est alors validée.

L'étalonnage de l'appareil se fait à l'aide de sels étalons d'humidités relatives calibrées à 11 %, 58 %, 84 % et 97 %, en fonction des échantillons à mesurer.

#### **1.2. Formules témoins**

Tous les composés sont pesés à l'aide d'une balance de précision New Classic MF (précision 0,0001 g) ou ML204/01 (précision 0,01 g) (Mettler Toledo) en fonction des masses.

Les formulations cosmétiques sont préparées à l'aide d'un agitateur de paillasse Turbotest Rayneri équipé d'une hélice à flux radial défloculeuse de taille adaptée à la quantité de formule préparée ainsi qu'au volume du bécher.

Dans certains cas, des matières premières peuvent être pré-mélangées avant d'être ajoutées à la formulation, elles sont alors homogénéisées par agitation magnétique (plaque d'agitation chauffante IKA C-MAG HS 10, Grosseron).

#### **1.3. Modélisation moléculaire**

Les structures moléculaires ont été construites avec le logiciel Gaussview 2.1. Les géométries ont été optimisées en minimisant les forces sur les atomes à l'aide du logiciel Gaussian03. La fonctionnelle de densité électronique est B3LYP et les bases 6-31+g(d,p). Le modèle du continuum polarisable (PCM) a été utilisé afin de modéliser les effets du solvant, l'eau dans notre cas.

## 2. ANALYSE HPLC DES EXTRAITS ET DOSAGE

### 2.1 Analyse HPLC des extraits de plantes

Les extraits de plante A, B et C ont été analysés par HPLC (Agilent 1200) muni d'un détecteur à barrettes de diodes (DAD *diode-array detector*). La séparation est réalisée au moyen d'une colonne analytique C18 Luna (Phenomenex, 250 × 4,6 mm, 5 µm, 100 Å), équipée d'une précolonne C18 (Phenomenex, 4 × 3,0 mm i.d.). La phase mobile est constituée d'eau (A) et d'acétonitrile (B) et parfois d'isopropanol (C) acidifiés avec 0,1% d'acide formique.

Le débit d'élution est de 1 mL/min et le gradient de solvant est décrit dans les Tableau 55 à Tableau 57, en fonction de la nature des échantillons. Les échantillons sont préparés à 20 mg/mL dans du méthanol et sont filtrés sur filtre PTFE 0,45 µm avant analyse. Tous les essais sont réalisés en triplica.

**Tableau 55 : gradient d'élution (% volumiques) des échantillons de plante A pour le dosage de l'actif.  $\lambda_{\text{Plante A}} = 300 \text{ nm}$ .**

| Temps (min) | Eau | Acétonitrile | Isopropanol |
|-------------|-----|--------------|-------------|
| 0           | 95  | 5            | -           |
| 5           | 95  | 5            | -           |
| 35          | 0   | 100          | -           |
| 37          | 0   | 100          | -           |
| 38          | 0   | 40           | 60          |
| 43          | 0   | 40           | 60          |

(Post-time = 10 min)

**Tableau 56 : gradient d'élution (% volumiques) des échantillons de plante B.  $\lambda_{\text{Plante B}} = 280 \text{ nm}$ .**

| Temps (min) | Eau | Acétonitrile | Isopropanol |
|-------------|-----|--------------|-------------|
| 0           | 95  | 5            | -           |
| 5           | 95  | 5            | -           |
| 35          | 0   | 100          | -           |
| 45          | 0   | 100          | -           |
| 55          | 0   | 40           | 60          |
| 60          | 0   | 40           | 60          |
| 65          | 95  | 5            | -           |

(Post-time = 0 min)

**Tableau 57 : gradient d'élution (% volumiques) des échantillons de plantes C.  $\lambda_{\text{Plante C}} = 280 \text{ nm}$ .**

| Temps (min) | Eau | Acétonitrile | Isopropanol |
|-------------|-----|--------------|-------------|
| 0           | 98  | 2            | -           |
| 5           | 98  | 2            | -           |
| 40          | 30  | 70           | -           |
| 43          | 30  | 70           | -           |
| 50          | 0   | 100          | -           |
| 52          | 0   | 100          | -           |
| 53          | 98  | 2            | -           |
| 63          | 98  | 2            | -           |

*(Post-time = 0 min)*

## 2.2 Dosage de l'actif de la plante A

Le dosage de l'actif d'intérêt dans la plante A à été réalisé à l'aide d'un standard, l'acide cinnamique (Sigma Aldrich). La méthode de dosage par HPLC-UV appliquée est décrite Tableau 58.

**Tableau 58 : gradient d'élution de l'acide cinnamique pour le dosage de l'actif dans la plante A.  $\lambda = 300 \text{ nm}$ .**

| Temps (min) | Eau | Acétonitrile | Isopropanol |
|-------------|-----|--------------|-------------|
| 0           | 95  | 5            | -           |
| 5           | 95  | 5            | -           |
| 35          | 0   | 100          | -           |

*(Post-time = 10 min)*

La courbe étalon est établie à partir de 5 points échelonnés de 6,25 à 150  $\mu\text{g/mL}$  en triplica avec une erreur relative inférieure à 9 %. L'équation de la courbe obtenue par régression linéaire est :

$$y = 110,53x + 319,13 ; R^2 = 0,99876$$

Le dosage de l'actif dans les extraits de plante A est alors exprimé en mg d'équivalent acide cinnamique/g d'extrait.

### 3. ANALYSES MICROBIOLOGIQUES

#### 3.1. Analyses microbiologiques des extraits végétaux

Les analyses microbiologiques des extraits végétaux ont été réalisées par la société Nixe (Sophia-Antipolis).

##### 3.1.1 Principe de la méthode d'analyse

L'analyse, effectuée par spectrophotométrie (mesure de densité optique DO), permet de mesurer l'inhibition de croissance du mycélium de différents champignons et l'inhibition de la multiplication de différentes bactéries et levures en présence du produit à tester.

##### 3.1.2 Milieux de culture, souches

L'eau utilisée pour la préparation des milieux et des essais est de l'eau distillée stérile, obtenue par autoclavage.

##### 3.1.2.1 Milieux de culture gélosés

La souche de champignon et la souche de levure utilisées pour le test sont cultivées sur de la gélose Sabouraud (SAB) en tube inclinés. Les souches de bactéries utilisées pour le test sont cultivées sur de la gélose Tripcase Soja Agar (TSA) en tube incliné (Tableau 59).

**Tableau 59 : composition des milieux SAB et TSA gélosés**

| Milieu SAB                 |            | Milieu TSA        |            |
|----------------------------|------------|-------------------|------------|
| Composition                | Masses (g) | Composition       | Masses (g) |
| Peptone pepsique de viande | 10,0       | Tryptone          | 10,0       |
| Glucose anhydre            | 36,4       | Extrait de levure | 5,0        |
| Agar                       | 10,0       | NaCl              | 10,0       |
| -                          | -          | Agar              | 15,0       |

##### 3.1.2.2 Milieux de culture liquide

Le test d'activité antifongique sur les spores et le test d'activité contre la levure se déroulent dans le milieu bouillon de Sabouraud (Bouillon de SAB). Le test d'activité antibactérien se déroule dans le milieu Tripcase Soja Bouillon (TSB) (Tableau 60).

**Tableau 60 : composition des milieux SAB et TSB liquides**

| Milieu Bouillon de SAB      |            | Milieu TSB        |            |
|-----------------------------|------------|-------------------|------------|
| Composition                 | Masses (g) | Composition       | Masses (g) |
| Peptone peptsique de viande | 10,0       | Tryptone          | 10,0       |
| Glucose anhydre             | 36,4       | Extrait de levure | 5,0        |
| -                           | -          | NaCl              | 10,0       |



### 3.1.2.3 Souches de référence

Les souches d'intérêts sont conservées dans une mycothèque. Une culture sur gélose SAB inclinée dans un tube à essai en verre à bords droits (60 ml) a été réalisée pour *Aspergillus niger* (AN) ATCC 16404 et pour *Candida Albicans* (CA) ATCC 10291. Une culture sur gélose TSA inclinée dans un tube à essai en verre à bords droits (60 ml) a été réalisée pour *Pseudomonas aeruginosa* (Pda) ATCC 9027 et *Staphylococcus aureus* (SA) ATCC 6538.

### 3.1.3 *Mode opératoire*

#### 3.1.3.1 Préparation des cultures

##### 3.1.3.1.1 Champignon

La souche de champignon est repiquée sur des boîtes de gélose SAB à partir des tubes de conservation de la mycothèque. Pour cela, un fragment de gélose portant du mycélium est mis en culture au centre de la boîte pour permettre au champignon de coloniser toute la surface. Un mycélium portant des spores est généralement obtenu au bout de quelques jours de culture (8 à 10 jours) dans une étuve thermostatée à 32°C. L'observation des boîtes et l'observation microscopique permettent de visualiser les spores produites.

##### 3.1.3.1.2 Bactéries et levure

Quelques jours avant l'essai, les souches de bactéries et la souche de levure sont repiquées dans des tubes inclinés de TSA (pour les bactéries) et SAB (pour la levure) à partir des tubes de conservation de la mycothèque. Pour cela, le tube incliné de référence est immergé avec 3 mL d'eau stérile. 10 µL de la suspension sont prélevés pour ensemer un nouveau tube TSA et SAB incliné. Après 24h de culture à 37°C, le tube est à nouveau immergé avec 3 mL d'eau stérile. 0,5 mL de cette suspension sont alors prélevés pour ensemer 10 mL de milieu TSB pour les bactéries et 10 mL de bouillon SAB pour la levure.

#### 3.1.3.2 Dosage des spores, de la levure et de la suspension bactérienne

##### 3.1.3.2.1 Dosage des spores

Les spores de AN sont directement accessibles en surface du mycélium : 3 mL de bouillon SAB stérile sont déposés à la surface de la boîte et les spores sont mises en solution avec un râteau (pipette pasteur coudée) en frottant la surface de la boîte. Cette manipulation doit se faire sous une hotte spécialement dédiée aux champignons sporulant.

Le surnageant est ensuite récupéré et le comptage est réalisé avec la cellule de Malassez pour connaître le titre (nombre de spores par mL) de la solution.

#### 3.1.3.2.2 Dosage de la suspension de levure et de la suspension bactérienne

La culture liquide dure quelques heures (2h à 3h) à 37°C jusqu'à ce que la suspension titre 0,6 DO à 620 nm.

#### 3.1.4 Conduite de l'essai

L'essai est réalisé sur une microplaque 96 puits. Les spores de AN, la suspension de levure CA, les suspensions bactériennes de Pda et SA sont mis en contact dans les puits avec la substance à analyser.

La première étape consiste à diluer la substance à examiner dans le milieu bouillon SAB (pour le champignon et la levure) ou le milieu TSB (pour les bactéries). Nous avons choisi de tester les extraits (200 mg/mL) à 2 % et 0,2 %. En effet, cela permet d'obtenir une concentration finale en extrait dans le puits de 0,4 % et 0,04 %, concentrations représentatives et comparables à l'efficacité obtenu avec notre témoin de synthèse (parahydroxybenzoate de méthyle sodé). Ces dilutions peuvent être réalisées de façon simple, comme indiqué dans le Tableau 61 :

**Tableau 61 : dilutions et préparations des essais en microplaques**

| Dilution finale de la substance à examiner         | 1/50<br>0,4 % | 1/500<br>0,04 % |
|--|---------------|-----------------|
| Dilution préalable de la substance à examiner      | 1/25          | -               |
| Volume d'eau dans les puits                        | -             | 90 µL           |
| Volume de substance diluée                         | 100 µL        | 10 µL de 1/25   |
| Volume de milieu dans les puits                    | 95 µL         | 95 µL           |
| Volumes de suspensions de spores/bactéries/levures | 5 µL          | 5 µL            |

Nous préparons ainsi 100 microlitres de la dilution 1/25 de chaque extrait à tester et pour chacun des microorganismes testés. Deux répétitions sont effectuées. Un témoin négatif est également réalisé en remplaçant le volume de substance diluée (100 microlitres) par de l'eau. Un témoin positif est également réalisé en remplaçant le volume de substance diluée (100 microlitres) par 0,8 % de parahydroxybenzoate de méthyle sodé (soit 0,4 % final).

Nous ajoutons dans chaque puits, 100 microlitres de la dilution 1/25. Nous effectuons alors une dilution sérielle à partir de cette dilution (1/25) soit jusqu'à la dilution 1/250. Chaque puits est alors complété avec 95 µL de milieu bactéries, levures ou champignons selon le microorganisme testé. Nous ajoutons dans les puits 5 microlitres d'une solution titrant 40 spores/mL obtenue en diluant les spores récupérées sur les boîtes de culture

ou/et 5 microlitres d'une solution titrant 0,6 DO à 620 nm pour les bactéries et la levure. Pour bien homogénéiser les solutions, il est nécessaire de mélanger la solution de spores/bactéries/levures à celle contenant la substance à tester en réalisant deux ou trois va et vient avec la pipette.

Les boîtes 96 puits chargées sont déposées dans une atmosphère saturée en humidité et à 37°C.

La lecture s'effectue au lecteur de plaques à 620 nm à T0, T24h, T48h et T72 heures pour estimer la croissance du microorganisme en présence de la substance testée par rapport à la croissance du microorganisme dans les puits témoins. Pour les microorganismes non mobiles (*Staphylococcus* et *Candida*) il est nécessaire de mélanger le contenu des puits avant chaque lecture. Pour l' *Aspergillus* cela n'est pas utile car nous allons mesurer la croissance du mycélium.

### 3.2. Challenges tests

Les challenges tests sont réalisés suivant les critères de la Pharmacopée européenne par la société IDEATest (Plouzané).

#### PROTOCOLE EXPERIMENTAL :

#### Les souches testées sont les suivantes :

- **Souches bactériennes :**
  - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
  - *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
  - *Escherichia coli* (recommandée Ph. Eur.) ATCC 8739
- **Souches fongiques :**
  - *Candida albicans* ATCC 10231
  - *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

#### Conditions de préparation et de conservation :

Tableau 62 : tableau récapitulatif des conditions de préparation des souches.

| Souches                | Conservation | Milieux de culture        | Densités (UFC/mL)                | Températures d'incubation |
|------------------------|--------------|---------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| <i>P. aeruginosa</i>   | -80°C ± 5°C  | Trip-case Soja Agar (TSA) | 10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup> | 32,5°C ± 2,5°C            |
| <i>S. aureus</i>       | -80°C ± 5°C  | Trip-case Soja Agar (TSA) | 10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup> | 32,5°C ± 2,5°C            |
| <i>E. coli</i>         | -80°C ± 5°C  | Trip-case Soja Agar (TSA) | 10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup> | 32,5°C ± 2,5°C            |
| <i>C. albicans</i>     | -80°C ± 5°C  | Sabouraud Dextrose        | 10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup> | 22,5°C ± 2,5°C            |
| <i>A. brasiliensis</i> | -80°C ± 5°C  | Sabouraud Dextrose        | 10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup> | 22,5°C ± 2,5°C            |

**Produit à tester :**

Le produit à tester est réparti aseptiquement en flacons stériles à usage unique, à raison d'un flacon par souche testée. 20 g de produit sont prélevés dans chaque flacon.

**Mise en contact souche-produit :**

Chaque flacon de produit est inoculé avec la suspension d'une des souches à tester, afin d'obtenir une concentration finale de  $10^5$  à  $10^6$  microorganismes/g.

**Validation de la neutralisation :**

Elle est réalisée sur les 5 souches, à la dilution 1/10<sup>ème</sup> et 1/100<sup>ème</sup> dans un bouillon de LT100. La composition de ce neutralisant est décrite dans le Tableau 63.

Tableau 63 : composition de bouillon de LT100 utilisé pour la neutralisation des conservateurs

| LT100                           |              |
|---------------------------------|--------------|
| Composition                     | Masses (g/L) |
| Peptone pancréatique de caséine | 15,0         |
| Peptone papaïnique de soja      | 5,0          |
| L-Cystine                       | 0,7          |
| Chlorure de sodium              | 4,0          |
| Sulfite de sodium               | 0,2          |
| Glucose                         | 5,5          |
| Lécithine d'oeuf                | 1,0          |
| Polysorbate 80                  | 5,0          |
| Triton X100                     | 1,0          |

**Evolution des densités de souches dans le temps :**

Des prélèvements et analyses sont réalisés, à intervalles de temps donnés (T.2 jours, T.7 jours, T.14 jours, et T.28 jours), à partir des différents flacons ; la phase de neutralisation des conservateurs est effectuée en LT100 à la plus faible dilution compatible avec la validation. La méthode de dénombrement utilisée est l'inclusion (résultats en UFC/g ou mL).

Les produitsensemencés sont conservés à 22,5 °C à l'obscurité pendant les 28 jours du test.

**INTERPRETATION :**

Le compte-rendu précise les densités microbiennes obtenues au cours du suivi pour chaque souche testées et dresse un tableau de la conformité du produit cosmétique, par comparaison avec les seuils de réduction logarithmiques imposés par la Pharmacopée Européenne (Tableau 64).

**Tableau 64 : seuils de réductions logarithmiques devant être mesurés pour qu'un produit cosmétique soit conforme à la Pharmacopée Européenne**

| Pharmacopée Européenne |          |                         |     |      |      |
|------------------------|----------|-------------------------|-----|------|------|
| Souches                | Critères | Réduction logarithmique |     |      |      |
|                        |          | 2 J                     | 7 J | 14 J | 28 J |
| <b>Bactériennes</b>    | <b>A</b> | 2                       | 3   | /    | NI   |
|                        | <b>B</b> | /                       | /   | 3    | NI   |
| <b>Fongiques</b>       | <b>A</b> | /                       | /   | 2    | NI   |
|                        | <b>B</b> | /                       | /   | 1    | NI   |

(/ : pas d'abattement minimal requis, NI : pas d'augmentation)

Les critères A représentent l'efficacité qu'il est recommandé d'atteindre. Dans des cas justifiés, lorsque les critères A ne peuvent être respectés (e.g. en raison d'une augmentation du risque de réactions indésirables) les critères B s'appliquent. Une tolérance de  $\pm 0,3$  log est admise pour chaque critère.

## 4. FORMULATION DES EXTRAITS

### 4.1. Solubilisation des extraits

#### 4.1.1 Support solide

Afin de solubiliser l'extrait de plante A sur support maltodextrine dans les différentes matières premières liquides testées, l'extrait est ajouté par étape. Il est d'abord ajouté à 1 % (massique) dans les solvants et mis sous agitation magnétique à 40°C. Dans les cas où la solubilisation se montre difficile, l'échantillon est placé au bain à ultrasons pendant 30 min. A ce stade, si des résidus insolubles persistent, nous estimons la solubilité mauvaise dans le solvant testé. Pour les essais fructueux, la concentration en extrait est augmentée à 2 % et ainsi de suite jusqu'à définir le maximum de solubilité. Lorsque l'extrait est solubilisé à de fortes concentrations (dès 10 %), l'ensemble peut se montrer sombre et il peut être difficile de déceler la présence de particules insolubles. Dans ce cas, l'échantillon est observé à la lumière du jour et/ou laissé au repos pendant une nuit afin d'observer un éventuel dépôt au fond du récipient.

#### 4.1.2 Support liquide

L'ajout du support liquide avec l'extrait de plante est réalisé au cours de l'extraction du végétal. Une fois l'extraction au MeOH réalisée, le support cosmétique liquide est ajouté dans des proportions 50 : 50 extrait/support (m /m) puis le solvant est évaporé. Nous obtenons alors un extrait liquide plus ou moins visqueux en fonction de la matière première testée et plus ou moins homogène en fonction de la solubilité de l'extrait dans celle-ci.

## 4.2. Dosage de l'actif dans les produits cosmétiques : HPTLC

### 4.2.1 Préparation et incorporation des extraits en cosmétique

Les extraits que nous avons choisis pour être incorporés dans des produits cosmétiques et une analyse microbiologique sont les extraits pilotes de la plante A MeOH sur supports liquides cosmétiques S1, S2 et S3 ainsi qu'un extrait de plante C1.

Les supports liquides sont les suivants :

- S1 : éthylhexylglycérine stabilisée avec de la vitamine E (Sensiva SC50, Schülke, Gentilly)
- S2 : caprylyl glycol et éthylhexylglycérine stabilisée avec de la vitamine E (Sensiva SC10, Schülke, Gentilly)
- S3 : caprylyl glycol (Microcare Emollient CLG, Thor Personal Care, distribué par Coptis, Croissy-sur-Seine)

Les extraits de plante A sont incorporés sous leur forme liquide directement dans les produits cosmétiques en fin de formulation à 30 °C sous agitation.

L'extrait de plante C nécessite quant à lui une préparation préliminaire avant d'être incorporé dans le produit. Se présentant sous la forme d'une résine, il est tout d'abord réduit à l'état de poudre dans un mortier à l'aide d'un pilon. Il est ensuite mélangé dans du C12-15 alkyl benzoate, matière première cosmétique sélectionnée pour la solubilisation de l'extrait. La solution préparée contient 50 % massique d'extrait de plante C. Elle est mise sous agitation magnétique puis au bain à ultrasons pendant 1h. L'ensemble est ensuite filtré afin d'éliminer les résidus d'extraits avant incorporation dans la matrice cosmétique.

### 4.2.2 Développement de la méthode de dosage par HPTLC

Les analyses HPTLC ont été réalisées à l'aide d'un système Camag (Muttenez, Suisse) équipé d'une chambre de développement automatisée ADC2 avec contrôle de l'humidité, d'un visualiseur et d'un scanner 4 contrôlés par le logiciel WinCATS.

Les échantillons ont été déposés sur des plaques de gel de silice 60 F<sub>254</sub> (20 x 10 cm x 0,20 mm) fournies par Merck. Toutes les plaques ont été développées jusqu'à 70 mm à partir du bord inférieur, avec un contrôle de l'humidité variant de 33 à 38 % et 20 min de saturation.

Une inspection visuelle des plaques a systématiquement été réalisée à 254 et 366 nm ainsi qu'en lumière blanche.

Les plaques ont été scannées aux longueurs d'ondes définies au fil des développements de méthodes en mode réflexion, avec des lampes D2 (deutérium) et W (tungstène), la dimension des fentes étant fixée à 8,00 mm x 0,40 mm. La vitesse de scan est prédéfinie à 20 mm/s, avec une résolution de 100 µm/étape. 15 échantillons ont systématiquement

été appliqués sur chaque plaque (largeur de bande : 8 mm, vitesse de dépôt : 50 nL/s, distance entre échantillons : 11,4 mm, distance des bords externes : 20 mm).

Le Tableau 65 résume les 3 méthodes testées pour optimiser la méthode de dosage du principe actif de la plante A dans des matrices cosmétiques. La première méthode avait été développée dans le cadre de l'approfondissement de la connaissance phytochimique de l'extrait. Dans ce cadre, l'actif d'intérêt a été détecté avec un rapport frontal (Rf) de 0,65, facilement détectable par la couleur verte de la zone observée en lumière blanche après révélation à l'anisaldéhyde. Cet indice de rétention étant jugé trop élevé pour envisager un dosage optimal de l'actif ; la méthode a été revue afin de l'abaisser. De plus, l'application de cette méthode aux échantillons de crèmes cosmétiques contenant ou non l'extrait de plante a montré une co-élution de matières premières grasses avec l'actif de la plante (par analyse des densitogrammes).

Nous avons alors modifié les proportions en solvants dans la phase mobile selon la méthode 2. Après révélation à l'anisaldéhyde, nous avons pu constater que nous avons bien abaissé le Rf de l'actif à 0,43, mais qu'il y avait toujours un problème de co-élution.

Enfin, en modifiant de nouveau la phase mobile conformément à la méthode 3 et en effectuant le densitogramme de la plaque sans effectuer de révélation, nous avons pu constater que l'actif présente une bonne absorbance UV, avec un maximum à  $\lambda = 315$  nm, sans qu'il n'y ait de co-élution avec d'autres composés à cette longueur d'onde.

Cette dernière méthode a donc été retenue pour le dosage de l'actif.

**Tableau 65 : méthodes HPTLC testées pour l'optimisation du dosage de l'actif de l'extrait de plante A dans les crèmes cosmétiques.**

|  | Méthode 1                                       | Méthode 2                                     | Méthode 3                                     |
|--|---|---|---|
| <b>Phase mobile</b>  | Toluène/Ac. d'éthyle*/Ac. Formique<br>70 :30 :1 | Toluène/Ac. d'éthyle/Ac. Formique<br>96 :4 :1 | Toluène/Ac. d'éthyle/Ac. Formique<br>98 :2 :1 |
| <b>Densitomètre</b>  | -   | -   | Oui<br>$\lambda_{\max} = 315$ nm              |
| <b>Révélation</b>  | Anysaldéhyde                                    | Anysaldéhyde                                  | -   |
| <b>Densitomètre</b>  | $\lambda = 420$ nm                              | $\lambda = 420$ nm                            | -   |
| <b>Rf du principe actif de la plante A</b>                   | 0,65  | 0,43  | 0,42  |
| <b>Co-élution avec des composés de la matrice cosmétique</b> | Oui   | Oui   | Non   |

\* Ac. d'éthyle = Acétate d'éthyle ; Ac. Formique = Acide Formique

#### 4.2.3 Extraction de l'actif de plante A

Le dosage de l'actif dans les extraits bruts de plante A par HPLC et HPTLC est réalisé à partir d'échantillons d'extraits solubilisés dans du méthanol. Avant analyse, l'échantillon est extrait au bain à ultrasons pendant 15 min puis centrifugé afin de récupérer le surnageant limpide pour l'analyse. Nous avons donc choisi d'extraire l'actif de plante A incorporé dans les crèmes cosmétiques sur le même modèle. Pour ce faire, nous avons réalisé une dilution par 10 des échantillons de crème dans du MeOH. Les échantillons de crèmes dilués ont ensuite été homogénéisés au vortex suivi de 15 min aux ultrasons. Finalement, ils ont été centrifugés et le surnageant limpide prélevé pour réalisation de l'analyse (2 µL de dépôt systématique).

#### 4.2.4 Dosage de l'actif par HPTLC

Trois courbes d'étalonnages ont été effectuées à partir des trois extraits de plante A sur supports liquides. Ces trois courbes ont servi de support pour le dosage de l'actif dans les différentes crèmes contenant les extraits. Le dosage réalisé est un dosage relatif, basé sur la concentration en extrait dans nos échantillons et non pas sur la quantité réelle en actif car le standard utilisé pour l'étalonnage par HPLC (l'acide cinnamique) n'était pas adapté ici et nous n'avions pas d'actif isolé à disposition pour la réalisation d'un étalonnage à partir de celui-ci.

Nous avons systématiquement préparé une solution à 1 mg/mL en extrait et avons réalisé en triplica des dépôts de 1 ; 2 ; 6 ; 8 et 12 µL (par étapes de 1 ou 2 µL) pour la réalisation des courbes étalons. Les résultats obtenus sont exposés dans le Tableau 66.

**Tableau 66 : courbes d'étalonnage des extraits de plantes A sur les trois supports liquides par HPTLC, à 315 nm**

| Extraits    | Equations                           | R <sup>2</sup> | Erreur relative |
|-------------|-------------------------------------|----------------|-----------------|
| Plante A S1 | $y = -4,9053x^2 + 383,06x + 32,952$ | 0,99996        | <7,3 %          |
| Plante A S2 | $y = -6,0177x^2 + 439,99x + 32,172$ | 0,99933        | <6,4 %          |
| Plante A S3 | $y = -5,9473x^2 + 411,49x - 0,112$  | 0,99965        | <5,6 %          |

Chaque essai a été reconduit 3 fois afin d'évaluer la répétabilité. Pour cela, un même échantillon a été dosé 3 fois puis chaque échantillon a été préparé 3 fois afin d'effectuer les dosages.



## PARTIE II : ENCAPSULATION

### 1 DEVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UN SYSTEME D'ENCAPSULATION

#### 1.1 Gélation ionotropique

##### 1.1.1 Matières premières

Les deux grades d'alginate utilisés sont le Manugel GMB et le Protanal RF 6650 (FMC Biopolymer, Philadelphia, USA) Le Manugel GMB présente une viscosité de 110-270 mPa.s à 1%, le Protanal RF 6650 une viscosité de 400-600 mPa.s à 1%. Tout deux ont une forte capacité de réticulation. Le chlorure de calcium anhydre  $\text{CaCl}_2$  (granulés 1-2 mm) est fourni par Merckmillipore. L'extrait hydro-alcoolique d'*Hypericum perforatum* (millepertuis commun) est fourni par Naturex (Avignon) et la gomme de xanthane Satiaxane CX930 par Laserson (Etampes).

##### 1.1.2 Réticulation directe

Les solutions de calcium sont préparées par solubilisation du calcium dans l'eau sous agitation magnétique à température ambiante aux concentrations massiques suivantes : 1,0 % ; 2,0 ; 5,0 et 10,0 %.

Les solutions d'alginate sont préparées par dissolution des alginates saupoudrés dans l'eau sous agitation mécanique à l'aide d'un agitateur Turbotest Rayneri équipé d'une hélice à flux radial défloculeuse à 0,5 et 1 %.

L'extrait végétal est ajouté à 0,5 % (massique) dans les solutions d'alginate sous agitation.

Les capsules sont formées par addition goutte à goutte des solutions d'alginate dans les bains de calcium à l'aide d'une pipette de 1mL.

##### 1.1.3 Réticulation indirecte

Afin d'augmenter la densité des solutions de calcium, de la satiaxane CX930 est ajouté à 0,3 et 0,5 %. Pour cela, les solutions de calcium sont chauffées à 55 °C et la gomme y est saupoudrée sous agitation avec une hélice défloculeuse. L'agitation est poursuivie jusqu'à hydratation complète du polymère.

Les solutions de calcium à 1 et 10 % massique sont ajoutées goutte à goutte dans une solution à 1 % de Manugel GMB à l'aide d'une seringue de 5 mL équipée d'une aiguille, la distance entre l'aiguille et la solution d'alginate devant être supérieure à 10 cm.

## 1.2 Coacervation complexe : gomme arabique/lécithine

### 1.2.1 Matières premières

La gomme arabique utilisée est du Kahlgum 6644 (Brenntag), la lécithine de soja non purifiée est du SOLEC (Solae), la lécithine purifiée en phosphatidylcholine de l'Emulmetik 930 (Unipex, Lucas Meyer). L'huile de noyau d'abricot est fournie par Protival et l'huile essentielle de cannelle par Bernardi.

### 1.2.2 Protocole opératoire

Les capsules coacervées sont réalisées selon le protocole suivant :

- Disperser la lécithine dans l'eau distillée et ajuster à pH 8 afin d'optimiser la solubilisation
- Ajouter l'actif hydrophobe à encapsuler
- Homogénéiser pendant 5 min à 3300 tr/min
- Ajouter la solution de gomme arabique à 7,5 % massique
- Ajouter 10 mL d'eau distillée
- Maintenir la solution sous agitation magnétique 30 min à 50 °C pour permettre la réaction

### 1.2.3 Essais réalisés

Le Tableau 67 résume les différents protocoles testés.

**Tableau 67 : détails des différents essais réalisés par coacervation complexe entre une gomme arabique et des lécithines**

|                                     | Essai 1         |       | Essai 2          |       | Essai 3         |       | Essai 4          |       |
|-------------------------------------|-----------------|-------|------------------|-------|-----------------|-------|------------------|-------|
|                                     | m (g)           |       | m (g)            |       | m (g)           |       | m (g)            |       |
| Eau osmosée                         | 40,02           | 50,03 | 40,02            | 50,03 | 40,00           | 50,02 | 40,03            | 50,05 |
| Gomme arabique                      | 3,25            |       | 3,25             |       | 3,25            |       | 3,25             |       |
| Lécithine NP* ou P                  | 3,75 NP         |       | 3,75 NP          |       | 3,76 NP         |       | 3,76 P           |       |
| Ajustement pH 8                     | NaOH 2,5%       |       | NaOH 2,5%        |       | NaOH 8%         |       | NaOH 8%          |       |
| Huile NA (HNA) ou HE cannelle (HEC) | 1,02 HNA        |       | 0,99 HNA         |       | 0,51 HNA        |       | 0,50 HE Cannelle |       |
| Ajustement eau                      | 10,00           |       | 10,00            |       | 10,00           |       | 10,00            |       |
| Ajustement pH 4                     | Ac. Citrique 2% |       | Ac. Citrique 8 % |       | Ac. Citrique 8% |       | Ac. Citrique 8%  |       |

\*NP : non purifiée ; P : purifiée, HNA : huile de noyau d'abricot, HE Cannelle : huile essentielle de cannelle. Chaque case mise en valeur en rouge correspond à la modification de protocole apportée par rapport à la colonne précédente.

### 1.3 Vésicules multilamellaires type oignons

Les oignons sont préparés selon un protocole déjà établi [113,223]. La phase hydrophile est tout d'abord préparée. Les oignons sont produits dans un tube en verre de 4 mL dans lequel sont pesés les phospholipides et la phase hydrophile. L'ensemble est ensuite cisailé pendant environ 3 min avant d'être centrifugé 5 min à 4000 tr/min. Le mélange est de nouveau cisailé et centrifugé à deux reprises dans les mêmes conditions comme décrit sur la Figure 85. Ces étapes permettent dans un premier temps la bonne hydratation des phospholipides par la phase hydrophile (hydratation plus aisée avec l'eau qu'avec la matrice G-PG) et leur organisation en phase lamellaire et enfin, sous l'action du cisaillement et grâce à la composition des phospholipides, la formation des vésicules multilamellaires. Nous obtenons finalement une pâte qui est un concentré d'oignons que nous dispersons ensuite dans l'eau pour obtenir une dispersion d'oignons. Tout au long des travaux, les essais ont été formulés sur 200 à 1000 mg d'oignons.

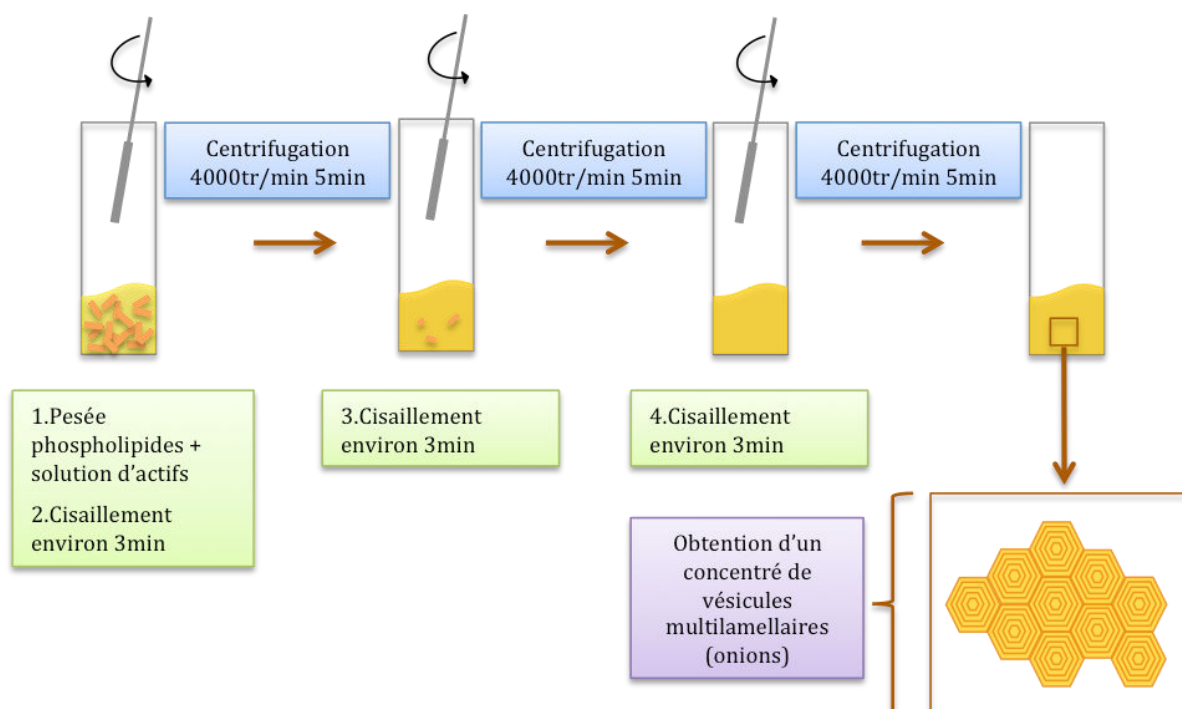


Figure 85 : représentation schématique de la préparation des oignons

## 2 DEVELOPPEMENT ET OPTIMISATION DES VESICULES MULTILAMELLAIRES : OIGNONS

### 2.1 Phospholipides

Les trois phospholipides comparés sont le Phospholipon 85G et le Lipoid 75H (Cosmetochem, Lipoid) ainsi que l'Emulmetik 930 (Unipex, Lucas Meyer).

## 2.2 Analytes modèles

Les deux premiers analytes étudiés pour l'encapsulation sont la rutine hydrate >94%, grade HPLC (Sigma-Aldrich) et la naringénine 98% (Sigma-Aldrich).

Puis le système a été élargi à différentes molécules conservatrices que sont l'acide benzoïque, l'acide salicylique (Sigma-Aldrich), les méthylisothiazolinone et méthylchloroisothiazolinone (MI/MCI) (Masso) et la chlorhexidine (Masso).

## 2.3 Solubilisation des actifs

La matrice G-PG, à base de glycérine (Interchimie, Compans, France) et propylène glycol (Interchimie, Compans, France) 60 : 40 v : v est préparée à l'avance et conservée à température ambiante. La viscosité de ces matières premières ne permet pas de prélèvement volumique. Sur la base des densités des matières premières ( $d_{\text{Glycérine}}=1,26$  et  $d_{\text{Propylène glycol}}=1,04$ ), nous préparons donc un mélange G-PG 64,6 : 35,4 m : m. Les actifs sont alors additionnés à cette matrice et solubilisés.

Les premiers essais contiennent de la rutine et de la naringénine à 30 et 8 mg/mL respectivement. Ces actifs ont été solubilisés dans la matrice G-PG sous agitation magnétique et chauffage à 40°C. Dans ces conditions, ces concentrations se sont avérées être les limites de solubilité des analytes. Par la suite, des essais ont été réalisés avec la rutine seule que nous sommes parvenus à solubiliser plus largement (jusque 70 mg/mL) en alternant l'agitation magnétique avec des étapes de 30 min au bain à ultrasons chauffé à 40°C. Si des résidus insolubles d'actifs persistaient après 6 passages aux ultrasons, alors nous estimions la limite de solubilité atteinte.

Les acides benzoïque et salicylique ont été solubilisés à 2,8 et 2,0 mg/mL respectivement dans l'eau et dans le G-PG sous agitation magnétique à température ambiante.

Les méthylisothiazolinone et méthylchloroisothiazolinone (MI/MCI) se présentant déjà sous forme d'une solution aqueuse diluée, nous l'avons directement encapsulée telle quelle.

La chlorhexidine digluconate utilisée est une solution aqueuse à 20 %. En fonction des essais, cette solution a été encapsulée telle quelle ou bien après avoir été diluée à 15 et 10 % dans l'eau, ou encore à 15 ; 10 ou 5% par ajout de la matrice G-PG. L'homogénéisation des solutions a été réalisée sous agitation magnétique.

## 2.4 Microscope optique

La formation des oignons ainsi que leur morphologie ont été observées à l'aide d'un microscope OPTECH Biostar BASP T (objectifs plans 4X, 10X, 40X, 100X). Le microscope est équipé d'un filtre à contraste de phase pour les objectifs 10X et 40X.

## 2.5 Granulométrie

Les mesures de taille de particules sont réalisées avec un granulomètre laser Mastersizer Hydro 2000S (Malvern Instrument GmbH). La gamme des tailles pouvant être mesurées par l'appareil est comprise entre 0,02 µm et 2 mm.

Les mesures ont été réalisées sur des dispersions de vésicules dans l'eau. Quatre mesures sont réalisées sur chaque échantillon. Les oignons sont préparés la veille de l'analyse et les dispersions le jour même. Quelques millilitres de dispersion sont nécessaires pour réaliser la mesure. L'agitation est réglée à 3500 tr/min et deux lavages successifs de la cuve d'analyse sont appliqués entre chaque mesure à l'eau distillée et aux ultrasons.

Les indices de réfractions (IR) des capsules ont été évalués suivant les indices de réfraction des matières premières les constituants et sur la base du calcul suivant :

$$IR = \sum_i x_i IR_i$$

Où  $x_i$  représente la fraction massique de l'ingrédient  $i$  dans les capsules, et  $IR_i$  l'indice de réfraction de l'ingrédient  $i$  mesuré à l'aide d'un réfractomètre 350 (Anton Paar GmbH, Allemagne) ou suivant les données de la littérature.

Le Tableau 68 donne les indices de réfraction des différents composés des capsules.

**Tableau 68 : indices de réfractions des composés des capsules**

| Composés                  | GPG (IR mesuré) | GPG+rutine/<br>naringénine<br>(IR mesuré) | Eau (donnée<br>de la<br>littérature) | Lécithine<br>(données de la<br>littérature<br>[251,252]) |
|---------------------------|-----------------|---|--------------------------------------|--|
| Indices de<br>réfractions | 1,4578±0,0008   | 1,4631±0,0005                             | 1,3303                               | 1,42-1,49  |

Nous avons alors calculé les valeurs des indices de réfraction à partir des indices de réfraction bas et haut pour la lécithine et avons calculé leurs moyennes, données que nous avons utilisées pour réaliser nos mesures (Tableau 69).

**Tableau 69 : indices de réfractions calculés des capsules en fonction de la composition**

| Système                   | Lécithine/GPG<br>45 :55 | Lécithine/GPG<br>+rutine/narin<br>génine<br>45 :55 | Lécithine/eau<br>45 :55 | Lécithine/GPG+r<br>utine<br>33/67 |
|---------------------------|-------------------------|--|-------------------------|-----------------------------------|
| Indices de<br>réfractions | 1,46                    | 1,46   | 1,39                    | 1,43                              |

## 2.6 Préparation des échantillons: Chromatographie d'exclusion stérique

Le fractionnement des dispersions de capsules a été réalisé avec une phase d'exclusion stérique Sephacryl 300HR (Sigma Aldrich), conservée dans un mélange eau/alcool à 4°C. La phase est conditionnée dans une colonne ouverte (1x10 cm).

Environ 4 mL de phase sont conditionnés pour le fractionnement des échantillons. Chaque colonne est reliée par un tuyau situé sur sa partie supérieure à un réservoir d'eau positionné 70 cm au dessus de celle-ci (Figure 86). Un débit d'eau d'environ 1 mL/min traverse alors la phase ainsi conditionnée.

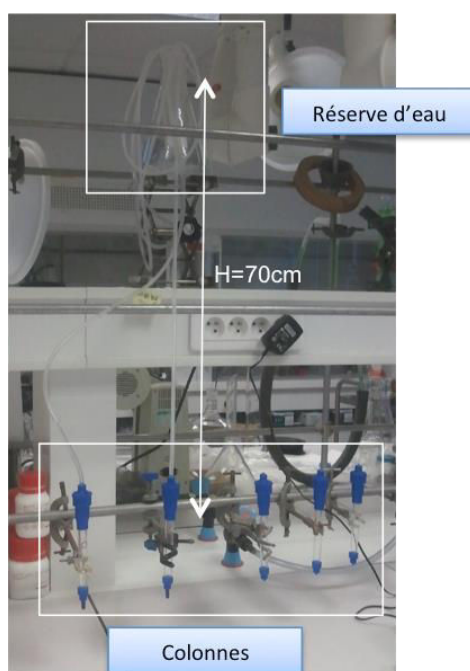


Figure 86 : photo du montage utilisé pour le fractionnement par exclusion

Avant tout dépôt d'échantillon, les colonnes sont systématiquement saturées avec 400  $\mu$ L d'une dispersion d'oignons blancs (sans actifs) à 20 mg/mL dans l'eau. La séparation entre les vésicules et les actifs non encapsulés est ensuite effectuée à partir de 400  $\mu$ L de l'échantillon d'oignons dispersés à 25 mg/mL dans l'eau. Cette concentration a été définie car à plus hautes concentrations, la viscosité de la dispersion empêche la pénétration de la phase.

Pour les premiers essais de faisabilité, le dépôt de l'échantillon s'est fait dans les 5 - 10 min suivant la préparation de la dispersion.

Après optimisation de la méthode, notamment observation du phénomène d'adsorption, le temps de dispersion systématiquement appliqué avant dépôt a été fixé à 3 h.

L'élution de l'échantillon est effectuée sous l'effet de la gravité, le solvant d'élution étant de l'eau. Un total de 50 mL de fractions est collecté. Le volume d'élution de la fraction

d'oignons est de 1,5 à 5 mL en fonction de la composition des oignons et donc de la taille des capsules formées. Les actifs libres sont élués entre 6 et 45 mL.

Dans le cadre de l'optimisation de la méthode et des essais de faisabilité, une autre phase d'exclusion a été utilisée, la Sephadex G10 (Sigma Aldrich). Cette phase se présente sous forme déshydratée. Elle doit donc être préalablement hydratée dans le solvant choisi, de l'eau dans notre cas. Nous avons poursuivi l'hydratation sur une nuit systématiquement. La phase a ensuite été conditionnée dans les mêmes conditions que la Sephacryl 300HR.

#### *2.6.1 Fractionnement des oignons : Rutine et Naringénine*

Les essais préliminaires de fractionnements n'ont pas montré de recouvrement entre la fraction d'oignons et l'élution des actifs libres. Ces fractionnements ont systématiquement été réalisés comme suit:

- Récupération de fractions de 0,5 à 2 mL entre 0 et 5 mL d'élution afin de récupérer les oignons ;
- Récupération de 3 fractions de 15 à 20 mL pour le dosage des actifs libres entre 5 et 50mL d'élution.

#### *2.6.2 Fractionnement des oignons : Acides benzoïque et salicylique*

Les essais préliminaires de fractionnement ont montré la possibilité d'un recouvrement entre la fraction d'oignons et les acides libres.

Nous avons alors réalisé une évaluation qualitative de l'encapsulation. Ici, la fraction d'oignons élue entre 1,5 et 5,7 mL. Nous avons alors récupéré cette fraction en 3 volumes comme suit :

- Volume de la fraction 1 prélevée: 1,6-1,8 mL
- Volume de la fraction 2 prélevée : 1,4-1,5 mL
- Volume de la fraction 3 prélevée : 0,3-1,0 mL

Cette méthode assure l'absence d'acide libre dans les fractions 1 et 2. Le début d'élution des actifs libres est aisément détecté par une très forte augmentation de la concentration en actif dosé. L'élution de l'actif libre est systématiquement détectée dans la fraction 3. Cette méthode permet de vérifier si l'actif est encapsulé grâce à l'analyse des fractions 1 et 2 (la fraction 1 étant la plus concentrée en oignons). La méthode donne un résultat qualitatif sur la présence ou l'absence d'actifs dans la fraction d'oignons.

#### *2.6.3 Fractionnement des oignons : Méthylchloroisothiazolinone et Méthylisothiazolinone*

Les essais préliminaires de fractionnement ont montré la possibilité d'un fort recouvrement entre la fraction d'oignons et les actifs libres.

Nous avons alors réalisé une évaluation qualitative de l'encapsulation. Ici, la fraction d'oignons élue entre 1,5 et 7,0 mL. Nous avons alors récupéré cette fraction en 3 volumes comme suit :

- Volume de la fraction 1 prélevée : 1,7-1,8 mL
- Volume de la fraction 2 prélevée : 1,7-1,8 mL
- Volume de la fraction 3 prélevée : 1,7-1,8 mL

Cette méthode assure l'absence d'acide libre dans la fraction 1 (fraction la plus concentrée en oignons) et permet de détecter le début l'élution des actifs libres dans les fractions 2 et 3. Le début d'élution des actifs libres est aisément détecté par une très forte augmentation de la concentration en actif dosé. L'élution de l'actif libre est systématiquement détectée dans les fractions 2 et 3. Cette méthode permet de vérifier si l'actif est encapsulé grâce à l'analyse de la fraction 1 (fraction la plus concentrée en oignons). La méthode donne un résultat qualitatif sur la présence ou l'absence d'actifs dans la fraction 1.

#### 2.6.4 Fractionnement des oignons : Chlorhexidine

Les essais préliminaires de fractionnement ont montré la possibilité d'un fort recouvrement entre la fraction d'oignons et les actifs libres.

Nous avons alors réalisé une évaluation qualitative de l'encapsulation. Ici, la fraction d'oignons élue entre 1,5 et 5,5 mL. Nous avons alors récupéré cette fraction en 6 volumes comme suit :

- Volume de la fraction 1 : 1,4-1,6 mL
- Volume de la fraction 2 : 0,4-0,6 mL
- Volume de la fraction 3 : 0,4-0,6 mL
- Volume de la fraction 4 : 0,4-0,6 mL
- Volume de la fraction 5 : 0,4-0,6 mL
- Volume de la fraction 6 : 0,4-0,6 mL

Cette méthode assure l'absence d'acide libre dans les fractions 1 à 3. Le début d'élution des actifs libres est aisément détecté par une très forte augmentation de la concentration en actif dosé. L'élution de l'actif libre est systématiquement détectée dans la fraction 6, parfois dès la fraction 5 et rarement dès la fraction 4. Cette méthode permet de vérifier si l'actif est encapsulé et de calculer des rendements d'encapsulations car les fractions 4 à 6 ne contiennent que des traces de capsules en comparaison avec les fractions 1 à 3.

## 2.7 Méthode de séparation : Ultracentrifugation

Les échantillons ont été séparés à l'aide d'une ultracentrifugeuse Serval Discovery M150SE (rotor S100-AT6). Les séparations ont été effectuées sur 1 mL de dispersion



d'oignons à 40 mg/mL, à 55 000 tr/min pendant 5 h, à 4 °C. La vitesse d'accélération a été fixée à son maximum et celle de décélération à 50 % du frein.

## 2.8 Méthode de dosage par HPLC-DAD

Les dosages d'actifs ont été réalisés par HPLC (Agilent 1200) muni d'un détecteur à barrettes de diodes (DAD *diode-array detector*). La séparation est réalisée au moyen d'une colonne analytique C18 Luna (Phenomenex, 250 × 4,6mm, 5 µm, 100 Å), équipée d'une précolonne C18 (Phenomenex, 4 × 3,0 mm i.d.). La phase mobile est constituée d'eau (A) et d'acétonitrile (B) et parfois d'isopropanol (C) acidifiés avec 0,1% d'acide formique.

Le débit d'élution est de 1 mL/min et le gradient de solvant est décrit dans les Tableau 70 à Tableau 73, en fonction de la nature des analytes. L'analyse des échantillons d'oignons contenant des phospholipides et le tensioactif de destruction (Triton X100) nécessite de prolonger l'élution avec un gradient d'isopropanol afin d'éliminer ces composés. L'analyse des spectres UV des composés a permis de définir les longueurs d'ondes judicieuses pour la détection et quantification de chacun des analytes. Le volume d'injection est fixé à 30 µL. Les courbes d'étalonnages sont obtenues par régressions linéaires sur 5 à 6 points sauf pour la chlorhexidine dont la courbe a été réalisée sur 9 points. Tous les essais sont réalisés en triplica.

**Tableau 70 : gradient d'élution (% volumique) des échantillons à base de rutine et/ou naringénine. Les fractions onions contiennent des phospholipides et du Triton X100.**

$\lambda_{\text{Rutine}} = 258 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Naringénine}} = 290 \text{ nm}$

| Temps (min) | Eau | Acétonitrile | Isopropanol |                      |
|-------------|-----|--------------|-------------|----------------------|
| 0           | 95  | 5            | -           | Fractions classiques |
| 5           | 95  | 5            | -           |                      |
| 20          | 38  | 62           | -           |                      |
| 21          | 0   | 100          | -           |                      |
| 23          | 0   | 100          | -           |                      |
| 28          | 0   | 60           | 40          | Fractions onions     |
| 33          | 0   | 60           | 40          |                      |
| 35          | 95  | 5            | 0           |                      |

(Post-time = 5 min)

**Tableau 71 : gradient d'élution (% volumique) des échantillons à base de méthylchloroisothiazolinone/méthylisothiazolinone.  $\lambda = 273$  nm.**

| Temps (min) | Eau | Acétonitrile | Isopropanol | Toutes<br>Fractions |
|-------------|-----|--------------|-------------|---------------------|
| 0           | 95  | 5            | -           |                     |
| 7           | 95  | 5            | -           |                     |
| 8           | 38  | 62           | -           |                     |
| 18          | 0   | 100          | -           |                     |

(Post-time = 10 min)

**Tableau 72 : gradient d'élution (% volumique) des échantillons à base d'acides benzoïque ou salicylique. Les fractions onions contiennent des phospholipides et du Triton X100.** $\lambda_{AcBenz} = 230$  nm,  $\lambda_{AcSal} = 234$  nm

| Temps (min) | Eau | Acétonitrile | Isopropanol | Fractions classiques |
|-------------|-----|--------------|-------------|----------------------|
| 0           | 95  | 5            | -           |                      |
| 5           | 95  | 5            | -           |                      |
| 19          | 38  | 62           | -           |                      |
| 20          | 0   | 100          | -           |                      |
| 22          | 0   | 100          | -           | Fractions<br>onions  |
| 27          | 0   | 60           | 40          |                      |
| 32          | 0   | 60           | 40          |                      |
| 34          | 95  | 5            | 0           |                      |

(Post-time = 5 min)

**Tableau 73 : gradient d'élution (% volumique) des échantillons à base de chlorhexidine. Les fractions onions contiennent des phospholipides et du Triton X100.  $\lambda = 258$  nm.**

| Temps (min) | Eau  | Acétonitrile | Isopropanol | Fractions classiques |
|-------------|------|--------------|-------------|----------------------|
| 0           | 95   | 5            | -           |                      |
| 5           | 95   | 5            | -           |                      |
| 17          | 49,4 | 50,6         | -           |                      |
| 18          | 0    | 100          | -           |                      |
| 20          | 0    | 100          | -           | Fractions<br>onions  |
| 25          | 0    | 60           | 40          |                      |
| 30          | 0    | 60           | 40          |                      |
| 32          | 95   | 5            | 0           |                      |

(Post-time = 5 min)

Les conditions de dosage et de réalisation de la courbe d'étalonnage pour chaque actif sont décrites dans le Tableau 74.

**Tableau 74 : conditions de dosages et courbes d'étalonnages de chaque actif analysé.**

|                   | Longueur d'onde (nm) | Gamme de concentration (µg/mL) | R <sup>2</sup> | Erreur relative (%) | T <sub>R</sub> (min) |
|-------------------|----------------------|--------------------------------|----------------|---------------------|----------------------|
| Rutine            | 258                  | 0,2 - 100                      | 0,99992        | <2,5                | 12,95                |
| Naringénine       | 290                  | 0,05 - 26,46                   | 0,99995        | <3,6                | 18                   |
| Acide Benzoïque   | 230                  | 0,28 - 140                     | 0,9994         | <0,8                | 12,9                 |
| Acide Salicylique | 234                  | 0,1 - 100                      | 0,9997         | <2,6                | 13,9                 |
| MCI/MI            | 273                  | -                              | -              | -                   | 1,9 et 2,85          |
| Chlorhexidine     | 258                  | 1,875-300                      | 0,99968        | <4,86               | 14,5                 |

## 2.9 Test d'activité anti-oxydante

Les mesures d'absorbances ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre Agilent 8453 (logiciel 845x UV-Vis) à 700 nm et d'une cuve en quartz (QS) 10 x 10 x 45 mm.

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH• a été calculé selon l'équation suivante :

$$I(\%) = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100$$

Où **A<sub>0</sub>** est l'absorbance du contrôle (sans actif) et **A<sub>1</sub>** l'absorbance de l'actif testé.

Une solution à 0,6 mmol/L de DPPH• est préparée dans un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O 75 : 25 (v/v). Pour cela, le DPPH• est pesé ; le MeOH est ensuite ajouté et l'ensemble est homogénéisé au bain à ultrasons puis l'eau est enfin additionnée. Cette solution est préparée avant chaque nouvelle analyse et conservée à l'abri de la lumière.

Le test est effectué sur 2 mL d'échantillon. Chaque échantillon contient 0,250 mL de solution de DPPH• et 1,750 mL de solution à tester.

Les échantillons de rutine libre, témoins du test, ont été préparés à partir d'une solution de rutine concentrée à 25 mg/mL dans le G-PG et diluée dans l'eau à 98 µg/mL. Cette dernière solution sert de base pour la préparation des 9 échantillons de concentration variant de 0,5 à 14 µg/mL. Le volume total de chaque échantillon est de 1,75 mL.

Les vésicules multi-lamellaires contenant la rutine encapsulée sont composées de lipides/G-PG 37 : 63 (m : m). La rutine est solubilisée dans le G-PG à 25 mg/mL. Une

dispersion mère à 25 mg/mL de capsules dans l'eau est préparée. Puis cette dispersion est diluée dans l'eau afin d'obtenir des échantillons contenant 2 ; 4 ; 5 ; 6 ; 8 et 10 µg/mL de rutine. Le volume total des dispersions diluées est de 1,75 mL pour les analyses.

Pour chaque essai, un échantillon contrôle est préparé. Cet échantillon possède la même composition que l'échantillon à tester, sans le principe actif (ici la rutine). L'absorbance mesurée est notée  $A_0$ . De plus, un blanc est systématiquement réalisé. Cet échantillon blanc possède la même composition que l'échantillon à tester sans le DPPH•. Enfin l'échantillon test contient le principe actif ainsi que le DPPH•.

Chaque échantillon est préparé comme suit :

- Ajout de la solution à tester dans un vial à vis (avec ou sans principe actif, avec ou sans capsules) :  $V=1,75$  mL
- Ajout de la solution de DPPH• 0,6mmol/L :  $V=0,250$  mL
- Homogénéisation manuelle des échantillons
- Conservation des échantillons à l'abri de la lumière pendant 30 min avant mesure des absorbances à 700 nm

L'erreur relative sur les mesures est inférieure à 10 % ( $<7,4$  %)

Tous les échantillons ont été mesurés en triplica.

## 2.10 Méthode de dosage par HPTLC

Les échantillons ont été déposés sur des plaques en verre de gel de silice 60 F<sub>254</sub> (20 x 10 cm x 0,20 mm) fournies par Merck. Toutes les plaques ont été développées jusqu'à 70 mm à partir du bord inférieur, avec un contrôle de l'humidité variant de 33 à 38 % et 20 min de saturation.

Une inspection visuelle des plaques a systématiquement été réalisée à 254 et 366 nm ainsi qu'en lumière blanche.

Les plaques ont été scannées à 366 nm en mode réflexion, avec des lampes D2 (deutérium) et W (tungstène), la dimension des fentes étant fixée à 8,00 mm x 0,40 mm. La vitesse de scan est prédéfinie à 20 mm/s, avec une résolution de 100 µm/étape. 15 échantillons ont systématiquement été appliqués sur chaque plaque (largeur de bande : 8 mm, vitesse de dépôt : 50 nL/s, distance entre échantillons : 11,4 mm, distance des bords externes : 20 mm).

La méthode appliquée utilise une phase mobile constituée d'acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau 100 : 11 : 11 : 26 suivi d'une révélation au NP (Natural Product composé de 1 g d'acide diphénylboronique aminoéthylester dans 200 mL de méthanol). Nous réalisons ensuite le densitogramme de la plaque à 366 nm pour le dosage de l'actif. La rutine présente alors un  $R_f$  de 0,30.

### 2.10.1 Dosage de la Rutine par HPTLC

Le dosage de la rutine a été effectué à partir d'une solution de rutine à 25 mg/mL dans la matrice G-PG diluée à 40 µg/mL dans l'eau. Des dépôts de 2 ; 4 ; 6 ; 8 et 10 µL ont été effectués en triplica à partir de 3 échantillons. Nous avons obtenu une courbe étalon d'équation :

$$Y = 0,0021x^2 + 2,9013x - 51,62 ; R^2 = 0,99997$$

L'erreur relative sur la mesure est inférieure à 10 %.

### 2.10.2 Validation de la méthode

Des échantillons témoins de capsules de rutine de composition lipides/G-PG 37 : 63, concentrée à 25 mg/mL en rutine dans le G-PG ont été préparés. Ces capsules ont été dispersées à 25 mg/mL dans l'eau puis fractionnées par SEC (dépôt 400 µL). La dispersion mère à 25 mg/mL a été diluée à 12,5 mg/mL pour être déposée sur la plaque HPTLC avec un volume de 2 µL. Les fractions de capsules ont été déposées sans traitement préalable. En effet, les solvants de la phase mobile détruisent les capsules et libèrent la rutine ; il n'est donc pas nécessaire de les détruire au Triton X100 dans ce cas. 2 µL de chaque fraction ont systématiquement été analysés. Tous les essais ont été réalisés en triplica, tous les fractionnements ayant été eux-mêmes réalisés en triplica.

L'échantillon de capsules sans actif a été préparé à partir de lipides/G-PG 37 : 63 sans rutine, dispersées à 25 mg/mL dans de l'eau, diluées à 12,5 mg/mL puis déposées à 2 µL sur la plaque pour analyse.

### 2.10.3 Préparation des échantillons

Les capsules préparées pour être incorporées dans les formules sont composées de lipides/G-PG 37 : 63. La rutine est solubilisée à 25 mg/mL dans le G-PG. Ces capsules sont ensuite dispersées à 400 mg/mL dans de l'eau avant d'être ajoutées en fin de formulation aux produits. Les échantillons ont été dispersés au vortex. Nous avons réalisé cette dispersion très concentrée en capsules afin de limiter au maximum les quantités à ajouter dans les produits.

#### 2.10.3.1 Lotion

Les capsules ont été incorporées dans les trois lotions testées suivant le même protocole. La première lotion correspond à la lotion témoin. Dans la deuxième lotion, le parfum et le tensioactif ont été retirés. Enfin, dans la troisième lotion, le tensioactif a été substitué par un mélange de glucoside caprylique et caprique.

La solution de capsules à 400 mg/mL a été ajoutée dans les différentes lotions afin d'obtenir une concentration de 25 mg/mL en capsules dans la lotion, soit 6,25 % v/v. Les échantillons ont été homogénéisés au vortex.

Un témoin de chaque lotion sans capsules a systématiquement été analysé pour vérifier l'absence de co-élution avec la rutine (dépôt 2  $\mu$ L).

Chaque lotion contenant les capsules a été analysée avant fractionnement (dépôt 2  $\mu$ L).

Chaque fraction de capsules récupérée a été analysée pour le dosage de la rutine encapsulée et le calcul des rendements d'encapsulation. 10  $\mu$ L de chaque fraction a été déposé sur les plaques. Ces 10  $\mu$ L ont été déposés par étape de 2  $\mu$ L afin de limiter l'étalement de la zone de dépôt.

#### 2.10.3.2 Crème

10 % de dispersion concentrée à 400 mg/mL en capsules a été ajouté dans le crème afin d'obtenir un produit contenant 40 mg/mL de capsules. Les échantillons ont été homogénéisés à l'aide d'une micro-spatule. L'ensemble a ensuite été dilué par 10 dans l'eau. Ces échantillons ont été homogénéisés au vortex.

Des échantillons témoins de crème sans capsules ont été préparés sur le même modèle.

4  $\mu$ L de ces échantillons témoins (avec et sans capsule) ont systématiquement été appliqués et analysés par HPTLC. Les dépôts ont été réalisés par étapes de 2  $\mu$ L pour limiter l'étalement de la zone de dépôt.

Les échantillons dilués contenant les capsules ont ensuite été centrifugés à 3000 rpm par étapes de 5 min afin de récupérer séparément les phases grasses et aqueuses.

La phase aqueuse ainsi prélevée a été déposée à hauteur de 12  $\mu$ L pour évaluer la répartition de la rutine dans celle-ci. Cette phase a ensuite été fractionnée par SEC. La fraction de capsules récupérée a été déposée (20  $\mu$ L) et analysée.

La phase grasse a été extraite au méthanol (1 g de phase grasse extraite avec 2 mL de MeOH). L'échantillon dilué a été homogénéisé au vortex, puis extrait par ultrasons (30 min) avant d'être centrifugé 5 min à 3000 rpm pour récupérer le surnageant chargé en actif. 8  $\mu$ L de cet échantillon ont été déposés (par étapes de 2  $\mu$ L) et analysés par HPTLC.

Afin de valider la méthode d'extraction de la rutine contenue dans la phase grasse au méthanol nous avons ajouté une quantité connue de rutine (252  $\mu$ g) à 1 g de phase grasse et l'avons extraite avec 2 mL de MeOH sur le même protocole que précédemment. 4  $\mu$ L du surnageant de méthanol enrichi en rutine ont été déposés et analysés par HPTLC.

Chaque échantillon a été préparé et analysé en triplica.

## CONCLUSION GENERALE

Les objectifs de cette thèse étaient d'optimiser le potentiel de formulations cosmétiques pour lutter contre les proliférations microbiennes, d'optimiser un ou des extraits végétaux antimicrobiens en vue d'une utilisation comme conservateur naturel pour la cosmétique et de développer un système d'encapsulation d'actifs naturels.

La première partie de ces travaux a mis en évidence la possibilité d'abaisser l'activité de l'eau, facteur limitant la croissance microbienne, par augmentation de la concentration en glycérine ou glycols usuels. Ces résultats ont montré que le nombre de groupements hydroxyles ainsi que leur position sur la chaîne carbonée influent sur la capacité de la molécule à interagir avec l'eau. Il a également été montré que le protocole de formulation, notamment l'ordre dans lequel sont ajoutés les ingrédients, impacte ce paramètre. Le challenge test réalisé pendant 14 jours sur la crème hydratante optimisée selon les critères pré-cités a montré un bénéfice sur les 3 bactéries étudiées mais pas sur les champignons et levures. Ces résultats ne permettent cependant pas d'attribuer le potentiel d'autoconservation antibactérien de cette formulation à la concentration en glycérine augmentée ou à l'activité de l'eau abaissée.

A partir des résultats antimicrobiens obtenus avec les extraits bruts de plantes A, B, C1 et C2, des essais d'optimisations de la forme finale de l'extrait ont été menés en se focalisant sur la plante A, première ressource végétale prometteuse du projet NATUBAVAL. Ces essais ont été réalisés dans le but de faciliter la manipulation de l'ingrédient final pour sa formulation en produits cosmétiques. Les études de mise sur supports ont révélé que les supports liquides étaient plus judicieux que le support solide. En effet, l'extrait sur support solide devait être pré-solubilisé avant son incorporation dans le produit fini, étape jugée délicate. Les extraits sur supports liquides ont quant à eux pu être directement ajoutés en fin de formulation sans que des contraintes spécifiques n'aient été décelées. Parmi les 3 supports liquides choisis, celui à base de caprylyl glycol s'est avéré le plus intéressant dans son association avec la plante A. Testé à 0,4 % en microplaques, il s'est montré très actif contre les 5 souches testées.

A partir des challenges tests, trois essais se sont particulièrement distingués. Un produit présente une conformité aux critères A de la Ph. Eur. sur les cinq souches. Il s'agit de la crème témoin contenant l'extrait de plante A sur support S3. Cet essai met particulièrement en évidence l'activité de l'extrait sur *A. brasiliensis*. L'essai contenant l'extrait de la plante A sur support S2 est tout à fait intéressant également car il s'avère conforme aux critères A sur 4 souches et aux critères B sur *A. brasiliensis* avec une augmentation de la décroissance sur cette levure entre 14 et 28 jours. Enfin, l'essai contenant l'extrait de plante A sur support S1 formulé dans la crème optimisée en  $a_w$  se montre prometteur car il présente une conformité aux critères A sur les 3 bactéries et le champignon tout en étant conforme aux critères B sur *A. brasiliensis*.

Nous observons globalement que les supports liquides choisis participent de manière conséquente à l'activité notamment contre les bactéries. Ces résultats ne nous

permettent donc pas d'évaluer l'apport des extraits sur ces micro-organismes. Bien que les essais de challenges tests contenant 0,5 % d'extraits ne se soient pas montrés suffisamment performants pour être poursuivis au-delà de 14 jours, ils ont permis de mettre en évidence l'activité de l'extrait sur *S. aureus* et *C. albicans* lorsqu'associé au support S2.

Nous observons par ailleurs que la souche qui se montre la plus résistante dans nos essais est *A. brasiliensis*. Cette résistance nous a alors permis de différencier les essais et de valider les trois plus prometteurs pour poursuivre le développement d'un ingrédient antimicrobien pour l'industrie cosmétique.

Afin de poursuivre le développement de cet ingrédient conservateur, plusieurs étapes doivent être envisagées. Tout d'abord, il est nécessaire de tester et comparer le potentiel de l'extrait décoloré par distillation moléculaire seul et associé au support liquide caprylyl glycol dans la crème témoin utilisée tout au long de ces essais. Les essais de décoloration au charbon actif doivent être approfondis, l'activité antimicrobienne d'un extrait décoloré chargé en actif devant être évaluée pour conclure sur la suite de l'optimisation de l'extrait. Le procédé d'extraction avec mise sur support caprylyl glycol devra ensuite être amélioré, en affinant le ratio plante A/support liquide. Ensuite, une optimisation de l'association avec la plante C1 peut être envisagée afin de renforcer l'activité contre *A. brasiliensis*. La concentration minimale d'inhibition restera alors à définir. Enfin, lorsque la remise en culture de la plante B aura permis de récolter suffisamment de matière végétale, il sera des plus intéressant de l'intégrer aux essais. Pour terminer, la (ou les) forme(s) d'ingrédient répondant à tous les critères d'exigences pourra être testé dans une plus large gamme de produits cosmétiques afin de définir la généralisation de son utilisation et les concentrations d'utilisation.

Par la suite, une méthode de dosage de l'actif principalement responsable de l'activité antimicrobienne de la plante A a été développée par HPTLC. Cette méthode a été développée pour pouvoir suivre une éventuelle cinétique de dégradation de cette molécule dans des matrices cosmétiques complexes. Les dosages réalisés pendant deux mois sur des crèmes conservées à température ambiante ont montré que la concentration en actif reste plutôt stable alors qu'une dégradation est observée après conservation à 42°C sur 5 semaines. Grâce à cette méthode, il devient possible de suivre le comportement de l'actif d'intérêt tout au long de la durée de vie du produit. Ce dosage pourra en particulier aider à définir le meilleur mode d'utilisation des produits cosmétiques (packaging, durée limite d'utilisation après ouverture), mais également à comparer la consommation de celui-ci en fonction de la nature des produits cosmétiques (lotion, crème, gel, shampoing...). Il serait également intéressant de vérifier la compatibilité de la méthode avec une plus large gamme de cosmétiques afin de définir ou détecter d'éventuelles matières premières susceptibles de co-éluer avec l'actif et d'interagir dans le dosage.

La deuxième partie de ces travaux a porté sur le développement d'un système d'encapsulation d'actifs naturels et synthétique. Le système sélectionné pour son



potentiel à encapsuler des molécules aux propriétés diverses est composé de phospholipides s'organisant en bicouches concentriques pour former des liposomes appelés oignons. Ces capsules présentent l'avantage d'être produites sans excès de matière à encapsuler. Les rendements d'encapsulation se voient alors augmentés par rapport aux liposomes « classiques ». Deux autres avantages majeurs sont l'absence de solvants organique dans le procédé de formulation et l'utilisation de matières premières d'origine naturelle. Ce système vésiculaire a pu être optimisé selon les contraintes du projet. En particulier, la nature de la phase hydrophile contenant les actifs composée d'un mélange de glycérine et de propylène glycol est novatrice. De plus, la mise au point de la méthode de séparation des actifs libres et encapsulés a mis en évidence un phénomène d'adsorption des actifs en surface des capsules. La méthodologie adoptée dans le traitement des échantillons ainsi que la mise en place d'un calcul mathématique ont permis de calculer les rendements réels d'encapsulation, résultat bien distincts du rendement considérant l'encapsulation et l'adsorption simultanées. Cette approche est tout à fait intéressante lors du développement d'un système d'encapsulation afin de mieux comprendre les phénomènes d'interactions entre les actifs et la membrane des capsules.

Les essais réalisés sur la rutine et la naringénine ont montré qu'environ 70 % des deux actifs étaient retenus par les oignons quelque soit leur concentration. Par contre, ils se sont nettement différenciés par leur partage en surface ou à l'intérieur des capsules. En effet, la rutine est majoritairement encapsulée (environ 65 %) pour de faibles rendements d'adsorption (environ 20 %). A l'inverse, la naringénine est fortement adsorbée (environ 70 %) et pas ou peu encapsulée (environ 12 %). Plusieurs hypothèses ont été envisagées pour expliquer ces phénomènes : les masses molaires, la polarité, la configuration et la glycosylation sont différents facteurs qui peuvent expliquer que l'encapsulation ou l'adsorption est privilégiée.

Par la suite, la composition des oignons a été optimisée en terme de rendement d'encapsulation de la rutine, actif principalement encapsulé. Deux modèles mathématiques ont été proposés afin de définir la composition lipide/phase hydrophile permettant d'obtenir une phase lamellaire gonflée à son maximum sans excès de phase hydrophile ainsi que la concentration optimale en actif dans cette phase lamellaire gonflée donnant le meilleur rendement d'encapsulation. Le système optimal est composé de 33 % de lipides et 67 % de phase hydrophile constituée de glycérine/propylène glycol 60 : 40 v/v additionnée de 30 mg/mL de rutine. Le rendement d'encapsulation de la rutine associé à cette composition est de 62,5 % soit 16,54  $\mu\text{mol}$  de rutine par gramme d'oignons. La cinétique de fuite de la rutine réalisée dans des conditions drastiques a mis en avant que la fuite est lente et qu'au bout de 31 jours, encore 16 % de l'actif se trouve encapsulé. Cette étude a également mis en évidence l'intérêt de l'encapsulation de la rutine, molécule instable qui se dégrade en quercétine en milieu aqueux, alors que la rutine encapsulée reste stable. La réalisation d'un test anti-oxydant au DPPH• a démontré la bonne protection de l'actif encapsulé,

tout en dévoilant la disponibilité de l'actif adsorbé et en confirmant le modèle de calcul du rendement d'encapsulation.

Le développement d'une méthodologie de préparation d'échantillons et de dosage par HPTLC a permis d'évaluer le comportement des capsules de rutine dans deux matrices cosmétiques : une lotion et une crème. Les essais réalisés dans le premier produit ont révélé une incompatibilité avec un tensioactif anionique : le PPG-1-PEG-9 lauryl glycol ether. Nos observations nous ont amené à supposer que ce solubilisant augmentait la perméabilité des bicouches lamellaires, entraînant une fuite rapide de la rutine. La suppression et la substitution de cette matière première par un autre tensioactif ont permis de conforter cette idée. Il serait alors d'intérêt de définir avec précision la nature des tensioactifs présentant une bonne compatibilité avec cette forme de capsules. Le calcul du rendement d'encapsulation après incorporation dans la crème est alors de  $27,3 \pm 3,2$  % d'encapsulation. Ceci signifie qu'environ 50 % de la rutine fuit lors de l'incorporation des capsules dans la crème. Ce résultat est très encourageant et montre qu'il est possible d'incorporer des actifs encapsulés dans des matrices très complexes. Il serait alors intéressant d'élargir ces essais à d'autres matrices et surtout de développer des formules cosmétiques limitant au maximum la fuite de l'actif. Enfin, l'étape suivante serait de suivre la cinétique de fuite de l'actif dans le produit et de corrélérer ces résultats avec l'activité revendiquée.

Suite à ces résultats, nous avons souhaité élargir l'encapsulation à d'autres molécules, sélectionnées parmi les conservateurs autorisés par la réglementation cosmétique. Nous avons alors observé que les petites molécules que sont les acides benzoïque, salicylique et les méthylchloroisothiazolinone et méthylisothiazolinone n'étaient pas encapsulées alors que la chlorhexidine, de poids moléculaire supérieur à la rutine l'était à hauteur de 40 à 50 % en fonction de la nature de la phase hydrophile. Les essais réalisés sur cette dernière molécule ont mis en avant l'influence de la nature de la phase hydrophile sur le phénomène d'adsorption.

Dans une ultime étape, le système a enfin été appliqué à l'encapsulation de l'extrait de plante A. L'extrait encapsulé se présentait sur support TCM, décoloré ou non par distillation moléculaire. Nous avons alors obtenu un excellent rendement d'encapsulation de l'actif suivi dans le cas de l'extrait décoloré. Avec  $89,1 \pm 2,1$  % d'encapsulation, ce dernier résultat est le meilleur obtenu tout au long de nos travaux. Après validation de ces rendements d'encapsulation sur l'extrait de plante finalisé pour la commercialisation, la dernière étape sera d'évaluer l'impact du système sur la protection antimicrobienne des produits cosmétiques.

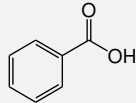
En conclusion, nos travaux présentent une avancée majeure dans la recherche de nouveaux conservateurs pour l'industrie cosmétique mais également un potentiel à plus large échelle pour les industries agro-alimentaire, du bâtiment (peintures), voire pharmaceutique. Les méthodes de dosages développées par HPTLC sont rapides et avantageuses pour du travail de routine. Les modèles mathématiques développés pour l'optimisation du système d'encapsulation à base de phospholipides sont des plus utiles

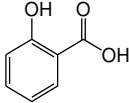
pour des développements systématiques. Enfin, les excellent résultats obtenus dans le cas de l'encapsulation de l'extrait de plante A sont des plus prometteurs pour la finalisation du projet tout en ouvrant une perspective des plus intéressante dans le cadre de l'encapsulation d'extraits végétaux par les phospholipides.



## ANNEXE 1

Liste des agents conservateurs admis dans les produits cosmétiques (Règlement CE 1223 2009 du parlement européen pour la cosmétique)

| N° d'ordre | Identification des substances  |   |  |  | Structure chimique  | Conditions d'utilisation                             |  |        | Libellé des conditions d'emploi et des avertissements |
|------------|--|---|--|--|---|--|--|--------|---|
|            | Nom chimique/DCl   | Dénomination commune du glossaire des ingrédients   | N° CAS   | N°CE   |   | Type de produit, parties du corps                    | Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi | Autres |   |
| 1          | Acide benzoïque et son sel de sodium   | Benzoic acid  | 65-85-0  | 200-618-2  |  | Produits à rincer, sauf les produits bucco-dentaires | 2,5 % (acide)  |        |   |
|            |  | Sodium Benzoate   | 532-32-1   | 208-534-8  |   | Produits bucco-dentaires                             | 1,7 % (acide)  |        |   |
|            |  |   |  |  |   | Produits sans rinçage                                | 0,5 % (acide)  |        |   |
| 1a         | Les sels d'acide benzoïque autres que ceux listés sous le numéro d'ordre 1 et les esters d'acide benzoïque | Ammonium benzoate, calcium benzoate, potassium benzoate, magnesium benzoate, MEA-benzoate, methyl benzoate, ethyl benzoate, propyl benzoate, butyl benzoate, isobutyl benzoate, isopropyl benzoate, phenyl benzoate | 1863-63-4, 2090-05-3, 582- 25-2, 553-70-8, 4337-66-0, 93-58-3, 93-89-0, 2315-68-6, 136-60-7, 120-50-3, 939-48-0, 93-99-2 | 217-468-9, 218-235-4, 209-481-3, 209-045-2, 224-387-2, 202-259-7, 202-284-3, 219-020-8, 205-252-7, 204-401-3, 213-361-6, 202-293-2 |   |  | 0,5 % (acide)  |        |   |
| 2          | Acide propionique et ses sels  | Propionic acid, ammonium pro- pionate, calcium propionate, magnesium propionate, potas- sium propionate, sodium pro- pionate  | 79-09-4, 17496-08-1, 4075- 81-4, 557-27-7, 327-62-8, 137- 40-6   | 201-176-3, 241-503-7, 223-795-8, 209-166-0, 206-323-5, 205-290-4   |   |  | 2 % (acide)  |        |   |

| N° d'ordre | Identification des substances        |   |   |   | Structure chimique  | Conditions d'utilisation                           |  |   | Libellé des conditions d'emploi et des avertissements  |
|------------|--------------------------------------|---|---|---|---|--|--|---|--|
|            | Nom chimique/DCI                     | Dénomination commune du glossaire des ingrédients   | N° CAS  | N°CE  |   | Type de produit, parties du corps                  | Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi | Autres  |  |
| 3          | Acide salicylique (1) et ses sels    | Salicylic acid, calcium salicylate, magnesium salicylate, MEA- salicylate, sodium salicylate, potassium salicylate, TEA- salicylate | 69-72-7, 824-35-1, 18917-89-0, 59866-70-5, 54-21-7, 578-36-9, 2174-16-5 | 200-712-3, 212-525-4, 242-669-3, 261-963-2, 200-198-0, 209-421-6, 218-531-3 |  |  | 0,5 % (acide)  | Ne pas utiliser dans les produits pour les enfants âgés de moins de 3 ans, à l'exception des shampoings | Ne pas employer chez les enfants de moins de 3 ans (2) |
| 4          | Acide sorbique et ses sels           | Sorbic acid, calcium sorbate, sodium sorbate, potassium sor- bate   | 110-44-1, 7492-55-9, 7757- 81-5, 24634-61-5                             | 203-768-7, 231-321-6, 231-819-3, 246-376-1                                  | 0,6 % (acide)   |  |  |   |  |
| 5          | Formaldéhyde et paraformaldéhyde (3) | Formaldehyde<br>Paraformaldehyde  | 50-00-0, 30525-89-4   | 200-001-8   |   | Produits bucco- dentaires                          | 0,1 % (en for- maldéhyde libre)                                | Ne pas utiliser dans les aéro- sols (sprays)  |  |
|            |                                      |   |   |   |   | Autres produits                                    | 0,2 % (en for- maldéhyde libre)                                |   |  |
| 6          | Déplacé ou supprime                  |   |   |   |   |  |  |   |  |
| 7          | Biphényle-2-ol et ses sels           | o-Phenylphenol, sodium o- phenylphenate, potassium o-phenylphenate, MEA o- phenylphenate  | 90-43-7, 132-27-4, 13707-65-8, 84145-04-0                               | 201-993-5, 205-055-6, 237-243-9, 282-227-7                                  |   |  | 0,2 % (en phénol)  |   |  |
| 8          | Pyrithione de zinc (4)               | Zinc pyrithione   | 13463-41-7  | 236-671-3   |   | Produits pour les cheveux et la pilosité du visage | 1,0 %  | Uniquement pour les produits à rincer   |  |
|            |                                      |   |   |   |   | Autres produits                                    | 0,5 %  |   |  |

| N° d'ordre | Identification des substances                      |   |  |   | Structure chimique | Conditions d'utilisation          |   |  | Libellé des conditions d'emploi et des avertissements |
|------------|--|---|--|---|--------------------|-----------------------------------|---|--|---|
|            | Nom chimique/DCI                                   | Dénomination commune du glossaire des ingrédients   | N° CAS   | N°CE  |                    | Type de produit, parties du corps | Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi                    | Autres                                     |   |
| 9          | Sulfites et bisulfites inorganiques (5)            | odum sulfite, ammonium bisulfite, ammonium sulfite, potassium sulfite, potassium hydrogen sulfite, sodium bisulfite, sodium metabisulfite, potassium metabisulfite  | 7757-83-7, 10192-30-0, 10196-04-0, 10117-38-1, 7773-03-7, 7631-90-5, 7681-57-4, 16731-55-8   | 231-821-4, 233-469-7, 233-484-9, 233-321-1, 231-870-1, 231-548-0, 231-673-0, 240-795-3  |                    |                                   | 0,2 % (en SO <sub>2</sub> libre)  |  |   |
| 10         | Déplacé ou supprime                                |   |  |   |                    |                                   |   |  |   |
| 11         | 1,1,1-Trichloro-2-méthylpropanol-2 (Chlorobutanol) | Chlorobutanol   | 57-15-8  | 200-317-6   |                    |                                   | 0,5 %   | Ne pas utiliser dans les aérosols (sprays) | Contient: Chlorobutanol                               |
| 12         | Acide p-hydroxybenzoïque, ses sels et esters       | 4-Hydroxybenzoic acid, methyl- paraben, butylparaben, potassium ethylparaben, potassium paraben, propylparaben, isobutylparaben, sodium methylparaben, sodium ethylparaben, sodium propylparaben, sodium butylparaben, sodium isobutylparaben, ethylparaben, sodium paraben, isopropylparaben, potassium methylparaben, potassium butylparaben, potassium propylparaben, sodium propylparaben, calcium paraben, phenylparaben | 99-96-7, 99-76-3, 94-26-8, 36457-19-9, 16782-08-4, 94-13-3, 4247-02-3, 5026-62-0, 35285-68-8, 35285-69-9, 36457-20-2, 84930-15-4, 120-47-8, 114-63-6, 4191-73-5, 2611-07-2, 38566-94-8, 84930-17-4, 35285-69-9, 69959-44-0, 17696-62-7 | 202-804-9, 202-785-7, 202-318-7, 253-048-1, 240-830-2, 202-307-7, 224-208-8, 225-714-1, 252-487-6, 252-488-1, 253-049-7, 284-595-4, 204-399-4, 204-051-1, 224-069-3, 247-464-2, 254-009-1, 284-597-5, 252-488-1, 274-235-4, 241-698-9 |                    |                                   | 0,4 % (en acide) pour un ester<br><br>0,8 % (en acide) pour les mélanges d'esters |  |   |

| N° d'ordre | Identification des substances  |   |                                 |                      | Structure chimique | Conditions d'utilisation          |  |  | Libellé des conditions d'emploi et des avertissements |
|------------|--|---|---------------------------------|----------------------|--------------------|-----------------------------------|--|--|---|
|            | Nom chimique/DCI   | Dénomination commune du glossaire des ingrédients | N° CAS                          | N°CE                 |                    | Type de produit, parties du corps | Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi   | Autres                                     |   |
| 13         | Acide déhydroacétique et ses sels  | Dehydroacetic acid, sodium dehydroacetate         | 520-45-6, 4418-26-2, 16807-48-0 | 208-293-9, 224-580-1 |                    |                                   | 0,6 % (en acide)   | Ne pas utiliser dans les aérosols (sprays) |   |
| 14         | Acide formique et son sel de sodium  | Formic acid, sodium formate                       | 64-18-6, 141-53-7               | 200-579-1, 205-488-0 |                    |                                   | 0,5 % (en acide)   |  |   |
| 15         | 1,6-Di (4-amidino-2-bromophénoxy)-n-hexane (Dibromohexamidine) et ses sels (y compris l'isethionate) | Dibromohexamidine Isethionate                     | 93856-83-8                      | 299-116-4            |                    |                                   | 0,1 %  |  |   |
| 16         | Thiosalicylate d'éthylmercure sodique (Thiomersal)   | Thimerosal  | 54-64-8                         | 200-210-4            |                    | Produits pour les yeux            | 0,007 % (en Hg)<br><br>En cas de mélange avec d'autres composés mercuriels autorisés par le présent règlement, la concentration maximale en Hg reste fixée à 0,007 % |  | Contient: Thio-salicylate d'éthyl-mercure sodique     |



| N° d'ordre | Identification des substances                            |   |   |   | Structure chimique | Conditions d'utilisation          |  |                                     | Libellé des conditions d'emploi et des avertissements |
|------------|--|---|---|---|--------------------|-----------------------------------|--|-------------------------------------|---|
|            | Nom chimique/DCI   | Dénomination commune du glossaire des ingrédients   | N° CAS  | N°CE  |                    | Type de produit, parties du corps | Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi   | Autres                              |   |
| 17         | Phénylmercure et ses sels (y compris le borate)          | Phenyl Mercuric Acetate, Phenyl Mercuric Benzoate   | 62-38-4, 94-43-9  | 200-532-5, 202-331-8                                  |                    | Produits pour les yeux            | 0,007 % (en Hg)<br>En cas de mélange avec d'autres composés mercuriels autorisés par le présent règlement, la concentration maximale en Hg reste fixée à 0,007 % |                                     | Contient des composés phénylmercuriels                |
| 18         | Acide undécylénique et ses sels                          | Undecylenic acid, potassium undecylenate, sodium undecylenate, calcium undecylenate, TEA-undecylenate, MEA-undecylenate | 112-38-9, 6159-41-7, 3398-33-2, 1322-14-1, 84471-25-0, 56532-40-2 | 203-965-8, 222-264-8, 215-331-8, 282-908-9, 260-247-7 |                    |                                   | 0,2 % (en acide)   |                                     |   |
| 19         | 1,3-bis(2-Éthylhexyl)hexahydro-5-méthyl-5-pyrimidinamine | Hexetidine  | 141-94-6  | 205-513-5   |                    |                                   | 0,1 %  |                                     |   |
| 20         | Bromo-5-nitro-5 dioxane 1,3                              | 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane   | 30007-47-7  | 250-001-7   |                    | Produits à rincer                 | 0,1 %  | Éviter la formation de nitrosamines |   |
| 21         | Bromo-2 nitro-2 propanediol 1,3 (Bronopol)               | 2-Bromo-2-nitropropane-1,3- diol  | 52-51-7   | 200-143-0   |                    |                                   | 0,1 %  | Éviter la formation de nitrosamines |   |
| 22         | Alcool dichloro-2,4-benzilyque                           | Dichlorobenzyl Alcohol  | 1777-82-8   | 217-210-5   |                    |                                   | 0,15 %   |                                     |   |

| N° d'ordre | Identification des substances  |   |                                     |           | Structure chimique | Conditions d'utilisation                                 |  |   | Libellé des conditions d'emploi et des avertissements |
|------------|--|---|-------------------------------------|-----------|--------------------|--|--|---|---|
|            | Nom chimique/DCI   | Dénomination commune du glossaire des ingrédients | N° CAS                              | N° CE     |                    | Type de produit, parties du corps                        | Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi | Autres  |   |
| 23         | 1-(4-Chlorophényl)-3-(3,4-dichlorophényl)urée (6)                                    | Triclocarban                                      | 101-20-2                            | 202-924-1 |                    |  | 0,2 %  | Critères de pureté:<br><br>3-3'-4-4'-Tétrachloroazobenzène < 1 ppm<br><br>3-3'-4-4'-Tétrachloroazoxybenzène < 1 ppm |   |
| 24         | Chlorocrésol   | p-Chloro-m-Cresol                                 | 59-50-7                             | 200-431-6 |                    | Ne pas utiliser dans les produits destinés aux muqueuses | 0,2 %  |   |   |
| 25         | 5-Chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy) phénol  | Triclosan   | 3380-34-5                           | 222-182-2 |                    |  | 0,3 %  |   |   |
| 26         | Chloroxylénol  | Chloroxylenol                                     | 88-04-0                             | 201-793-8 |                    |  | 0,5 %  |   |   |
| 27         | N,N''-Méthylènebis[N'-(3-(hydroxyméthyl)-2,5-dioximidazolidine-4-yl)]urée]           | Imidazolidinyl urea                               | 39236-46-9                          | 254-372-6 |                    |  | 0,6 %  |   |   |
| 28         | α, ω-bis[[[(Aminoiminométhyl)amino]iminométhyl]amino]poly(méthylène), dichlorhydrate | Polyaminopropyl biguanide                         | 70170-61-5, 28757-47-3, 133029-32-0 |           |                    |  | 0,3 %  |   |   |
| 29         | Phénoxy-2-éthanol  | Phenoxyethanol                                    | 122-99-6                            | 204-589-7 |                    |  | 1,0 %  |   |   |
| 30         | Méthénamine  | Methenamine                                       | 100-97-0                            | 202-905-8 |                    |  | 0,15 %   |   |   |
| 31         | Chlorure de 1-(3-chloroallyl)-3,5,7-triaza-1-azonia adamantane                       | Quaternium-15                                     | 4080-31-3                           | 223-805-0 |                    |  | 0,2 %  |   |   |

| N° d'ordre | Identification des substances  |  |                                   |                      | Structure chimique | Conditions d'utilisation             |   |        | Libellé des conditions d'emploi et des avertissements |
|------------|--|--|-----------------------------------|----------------------|--------------------|--------------------------------------|---|--------|---|
|            | Nom chimique/DCI   | Dénomination commune du glossaire des ingrédients                          | N° CAS                            | N°CE                 |                    | Type de produit, parties du corps    | Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi  | Autres |   |
| 32         | 1-Imidazolyl-1-(4-chlorophénoxy) 3,3-diméthyl-butane-2-one   | Climbazole   | 38083-17-9                        | 253-775-4            |                    |                                      | 0,5 %   |        |   |
| 33         | Diméthylol, diméthylhydantoïne   | DMDM Hydantoin   | 6440-58-0                         | 229-222-8            |                    |                                      | 0,6 %   |        |   |
| 34         | Alcool benzylique (7)  | Benzyl alcohol   | 100-51-6                          | 202-859-9            |                    |                                      | 1,0 %   |        |   |
| 35         | 1-Hydroxy-4-méthyl-6 (2,4,4- triméthyl-pentyl) 2-piridon et son sel de monoéthanol amine                                       | 1-Hydroxy-4-methyl-6-(2,4,4- trimethylpentyl) 2-pyridon, Piroctone Olamine | 50650-76-5, 68890-66-4            | 272-574-2            |                    | Produits à rincer<br>Autres produits | 1,0 %<br>0,5 %  |        |   |
| 36         | Déplacé ou supprime  |  |                                   |                      |                    |                                      |   |        |   |
| 37         | 2,2'-Méthylènebis(6-bromo-4- chlorophénol)   | Bromochlorophene   | 15435-29-7                        | 239-446-8            |                    |                                      | 0,1 %   |        |   |
| 38         | Isopropyl-métacrésol   | o-Cymen-5-ol   | 3228-02-2                         | 221-761-7            |                    |                                      | 0,1 %   |        |   |
| 39         | Chloro-5-méthyl-2-isothiazoline-4-one-3 + méthyl-2-isothiazoline-4-one-3 + du chlorure de magnésium et du nitrate de magnésium | Methylchloroisothiazolinone et Methylisothiazolinone                       | 26172-55-4, 2682-20-4, 55965-84-9 | 247-500-7, 220-239-6 |                    |                                      | 0,0015 % (d'un mélange dans un rapport 3:1 de chloro-5- méthyl-2-isothiazoline-4- one-3 et méthyl-2-isothiazoline-4- one-3) |        |   |
| 40         | Benzyl-2-chloro-4-phénol   | Chlorophene  | 120-32-1                          | 204-385-8            |                    |                                      | 0,2 %   |        |   |
| 41         | Chloracétamide   | Chloroacetamide  | 79-07-2                           | 201-174-2            |                    |                                      | 0,3 %   |        | Contient: Chloroacetamide                             |

| N° d'ordre | Identification des substances  |  |   |   | Structure chimique | Conditions d'utilisation              |  |  | Libellé des conditions d'emploi et des avertissements |
|------------|--|--|---|---|--------------------|---------------------------------------|--|--|---|
|            | Nom chimique/DCI   | Dénomination commune du glossaire des ingrédients  | N° CAS  | N° CE   |                    | Type de produit, parties du corps     | Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi | Autres                                     |   |
| 42         | N,N''-bis(4-Chlorophényl)-3,12-diimino-2,4,11,13-tétrazatétradécanediamine: acétate, gluconate et chlorhydrate       | Chlorhexidine, Chlorhexidine Diacetate, Chlorhexidine Digluconate, Chlorhexidine Dihydrochloride   | 55-56-1, 56-95-1, 18472-51-0, 3697-42-5                                 | 200-238-7, 200-302-4, 242-354-0, 223-026-6                                  |                    |                                       | 0,3 % (en chlorhexidine)                                       |  |   |
| 43         | Phénoxypropanol (8)  | Phenoxyisopropanol   | 770-35-4  | 212-222-7   |                    | Uniquement pour les produits à rincer | 1,0 %  |  |   |
| 44         | Alkyl (C <sub>12-22</sub> ) triméthyl ammonium, bromure de, chlorure de  | Behentrimonium chloride, cetrimonium bromide, cetrimonium chloride, laurrimonium bromide, laurrimonium chloride, steartrimonium bromide, steartrimonium chloride | 17301-53-0, 57-09-0, 112-02-7, 1119-94-4, 112-00-5, 1120-02-1, 112-03-8 | 241-327-0, 200-311-3, 203-928-6, 214-290-3, 203-927-0, 214-294-5, 203-929-1 |                    |                                       | 0,1 %  |  |   |
| 45         | 4,4-Diméthyl-1,3-oxazolidine   | Dimethyl Oxazolidine   | 51200-87-4  | 257-048-2   |                    |                                       | 0,1 %  | pH>6                                       |   |
| 46         | N-(Hydroxyméthyl)-N-(dihydroxyméthyl-1,3-dioxo-2,5-imidazolidinyl-4)-N-(hydroxyméthyl) urée                          | Diazolidinyl Urea  | 78491-02-8  | 278-928-2   |                    |                                       | 0,5 %  |  |   |
| 47         | 4,4'-(1,6-Hexanediylbis(oxy)) bis-benzèncarboximidamide et ses sels (incluant l'iséthionate et le p-hydroxybenzoate) | Hexamidine, Hexamidine diisethionate, Hexamidine paraben   | 3811-75-4, 659-40-5, 93841-83-9   | 211-533-5, 299-055-3  |                    |                                       | 0,1 %  |  |   |
| 48         | Glutaraldéhyde (1,5-pentanedial)   | Glutaral   | 111-30-8  | 203-856-5   |                    |                                       | 0,1 %  | Ne pas utiliser dans les aérosols (sprays) | Contient: Glutaral (9)                                |

| N° d'ordre | Identification des substances   |  |   |   | Structure chimique | Conditions d'utilisation  |  |  | Libellé des conditions d'emploi et des avertissements |
|------------|---|--|---|---|--------------------|---|--|--|---|
|            | Nom chimique/DCI  | Dénomination commune du glossaire des ingrédients                      | N° CAS  | N°CE  |                    | Type de produit, parties du corps   | Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi | Autres   |   |
| 49         | 5-Éthyl-3,7-dioxa-1-azabicyclo [3.3.0] octane   | 7-Ethylbicyclooxazolidine  | 7747-35-5   | 231-810-4   |                    |   | 0,3 %  | Ne pas utiliser dans les pro- duits bucco- dentaires et dans les pro- duits destinés aux muqueuses   |   |
| 50         | 3-(p-Chlorophénoxy)-propane- 1,2 diol   | Chlorphenesin  | 104-29-0  | 203-192-6   |                    |   | 0,3 %  |  |   |
| 51         | Hydroxyméthylaminoacétate de sodium   | Sodium Hydroxymethylglycinate  | 70161-44-3  | 274-357-8   |                    |   | 0,5 %  |  |   |
| 52         | Chlorure d'argent déposé sur dioxyde de titane  | Silver chloride  | 7783-90-6   | 232-033-3   |                    |   | 0,004 % (en AgCl)  | 20 % AgCl (m/m) sur TiO <sub>2</sub> . Ne pas utiliser dans les produits pour les enfants âgés de moins de 3 ans, dans les produits bucco-dentaires et dans les pro- duits pour les yeux ou les lèvres |   |
| 53         | Chlorure de N,N-diméthyl-N-[2- [2-[4-(1,1,3,3-tétraméthylbutyl)phénoxy]éthoxy]éthyl] benzène- méthanamini- um | Benzethonium Chloride  | 121-54-0  | 204-479-9   |                    | a) Produits à rincer<br><br>b) Produits sans rinçage autres que les produits bucco- dentaires | 0,1 %  |  |   |
| 54         | Chlorure, bromure et saccharinate de benzalkonium (10)  | Benzalkonium chloride, benzalkonium bromide, benzalkonium saccharinate | 8001-54-5, 63449-41-2, 91080-29-4, 68989-01-5, 68424-85-1, 68391-01-5, 61789-71-7, 85409-22-9 | 264-151-6, 293-522-5, 273-545-7, 270-325-2, 269-919-4, 263-080-8, 287-089-1 |                    |   | 0,1 % (en chlorure de benzalkonium)                            |  | Éviter le contact avec les yeux                       |

| N° d'ordre | Identification des substances        |   |            |           | Structure chimique | Conditions d'utilisation   |  |   | Libellé des conditions d'emploi et des avertissements  |
|------------|--------------------------------------|---|------------|-----------|--------------------|--|--|---|--|
|            | Nom chimique/DCI                     | Dénomination commune du glossaire des ingrédients | N° CAS     | N°CE      |                    | Type de produit, parties du corps  | Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi | Autres  |  |
| 55         | (Phénylméthoxy) méthanol             | Benzylhemiformal                                  | 14548-60-8 | 238-588-8 |                    | Produits à rincer  | 0,15 %   |   |  |
| 56         | Carbamate de 3-iodo-2-propynylbutyle | Iodopropynyl butylcarbamate                       | 55406-53-6 | 259-627-5 |                    | a) Produits à rincer<br>b) Produits sans rinçage<br>c) Déodorants/ antiperspirants | a) 0,02 %<br>b) 0,01 %<br>c) 0,0075 %                          | Ne pas utiliser pour les pro- duits bucco- dentaires et les produits pour les lèvres<br>a) Ne pas utili- ser dans des produits pour les enfants âgés de moins de 3 ans, sauf dans des produits de bain/des gels de douche et des sham- pooings<br>b) Ne pas utili- ser dans les lotions et crèmes pour le corps <sup>(13)</sup><br>b) et c) Ne pas utiliser dans des produits pour les enfants âgés de moins de 3 ans | a) Ne pas utiliser pour des enfants âgés de moins de 3 ans <sup>(11)</sup><br>b) et c) Ne pas utiliser pour des enfants âgés de moins de 3 ans <sup>(12)</sup> |
| 57         | 2-Méthyl-2H-isothiazole-3-one        | Methylisothiazolinone                             | 2682-20-4  | 220-239-6 |                    |  | 0,01 %   |   |  |

(1) Pour une utilisation autre que comme agent conservateur, voir annexe III, no 98.

(2) Uniquement pour les produits qui pourraient éventuellement être utilisés chez les enfants âgés de moins de 3 ans et qui restent en contact prolongé avec la peau.

(3) Pour une utilisation autre que comme agent conservateur, voir annexe III, no 13.

(4) Pour une utilisation autre que comme agent conservateur, voir annexe III, no 101.

(5) Pour une utilisation autre que comme agent conservateur, voir annexe III, no 99.

(6) Pour une utilisation autre que comme agent conservateur, voir annexe III, no 100.

(7) Pour une utilisation autre que comme agent conservateur, voir annexe III, nos 45 et 68.

(8) Pour une utilisation autre que comme agent conservateur, voir annexe III, no 54.

(9) Seulement si la concentration dépasse 0,05 %.

(10) Pour une utilisation autre que comme agent conservateur, voir annexe III, no 65.

(11) Uniquement pour les produits, autres que les produits de bain/gels de douche et shampoings, susceptibles d'être utilisés pour des enfants âgés de moins de 3 ans.

(12) Uniquement pour les produits susceptibles d'être utilisés pour des enfants âgés de moins de 3 ans.

(13) Concerne tous les produits destinés à être appliqués sur une partie étendue du corps.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] Règlement (CE) N° 1223/2009 du parlement européen et du conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques, *Journal officiel de l'Union Européenne*.
- [2] Martini, M-C., Pénétration cutanée. *Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie*, Ed., Tec & Doc/EM Inter, Chap. 3, (2003), p. 31-40.
- [3] Martini, M-C., Agents hydratants. *Actifs et Additifs en cosmétologie*, M-C. Martini & M. Seiller, Ed Lavoisier, Chap. 22, (2006), p. 435-456.
- [4] Lafforgue, C., Actifs anti-vieillessement. *Actifs et Additifs en cosmétologie*, M-C. Martini & M. Seiller, Ed Lavoisier, Chap. 27, (2006), p. 585-600.
- [5] Martini, M-C., Filtres Solaires. *Actifs et Additifs en cosmétologie*, M-C. Martini & M. Seiller, Ed Lavoisier, Chap. 26, (2006), p. 559-584.
- [6] Martini, M-C., Shampoings et savons liquides. *Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie*, Ed., Tec & Doc/EM Inter, Chap. 13, (2003), p. 175-192.
- [7] Neacsu, M., McMonagle, J., Fletcher, R.J., Scobbie, L., Duncan, G.J., Cantlay, L., de Roos, B., Duthie, G.G., and Russel, W.R., Bound phytophenols from ready-to-eat cereals: comparison with other plant-based foods. *Food Chemistry*, 141, (2013), 2880-2886.
- [8] Davidson, P.M., and Taylor, T.M., Chemocidal preservatives and natural antimicrobial compounds. *Food Microbiology*, (3<sup>rd</sup> Edition), M.P. Doyle & L.R. Beuchat, Ed. American Society for Microbiology, (2007), 713-745.
- [9] Olivero, J., Gracia, T., Payares, P., Vivas, R., Díaz, D., Daza, E., & Geerlings, P., Molecular structure and gas chromatographic retention behavior of the components of Ylang-Ylang oil. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, (1997), 86(5), p. 625-630.
- [10] Stashenko, E.E., Quiroz Prada, N., & Martínez, J.R., HRGC/FID/NPD and HRGC/MSD Study of Colombian Ylang-Ylang (*Cananga odorata*) oils obtained by different extraction techniques. *Journal of High Resolution Chromatography*, (1996), 19, p. 353-358.
- [11] Steinberg, D.C., Preservatives: a categorical examination. *Preservatives for Cosmetics*, Third Edition, Kozlowski, A.C. & Budzynski, B.W., Ed. Allured Books, (2012), p. 21-132.
- [12] <http://www.natrue.org/fr/meta/downloads/> (consulté le 7 janvier 2014)
- [13] Papp, I., Simándi, B., Blazics, B., Alberti, Á., Héthelyi, É., Svőke, & Kéry, Á., Monitoring volatile and non-volatile salicylates in *Filipendula ulmaria* by different chromatographic techniques. *Chromatographia*, (2008), 68, p. S125-S129.
- [14] Fourniat, J., Conservateurs antimicrobiens. *Actifs et Additifs en Cosmétologie*, Martini M-C. & Seiller M., Ed., 3<sup>e</sup> édition, Lavoisier. (2006), p. 763-807.
- [15] Shimamoto, T. & Hiroyuki, M., A model for the evaluation and prediction of preservative activity in oil-in-water emulsions. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 27,



(1979), p. 2743-2750.

[16] Ibarra, F., Dr. Straetmans, & Johnson, C.H., Natural preservation from concepts in nature. *Cosmetic & Toiletries*, (2008), p. 81.

[17] Varvaresou, A. & Papageorgiou, S., The development of self-preserving gels. *Household and Personal Care TODAY*, (2010), 4, p. 20-23.

[18] Sircar, D., Roychowdhury A., Mitra A., Accumulation of *p*-hydroxybenzoic acid in hairy roots of *Daucus carota*. *Journal of Plant Physiology*, 164, (2007), p. 1358-1366.

[19] Kang, Y-H., Parker, C.C., Smith, A.C. & Waldron, K.W., Characterization and distribution of phenolics in carrot cell walls, *Journal of Agricultural Chemistry*, 56, (2008), p. 8558-8564.

[20] Gorinstein, S., Leontowicz, H., Namiesnik, J., Najman, K., Drzewiecki, J., Cvikrova, M., Martincova, O., Katrich, E., & Trakhtenberg, S., Comparison of the Main Bioactive Compounds and Antioxidant Activities in Garlic and White and Red Onions after Treatment Protocols. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 56, (2008), p. 4418-4426.

[21] Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., & Martin-Belloso, O., Phenolic acids, flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity of strawberry juices processed by high-intensity pulsed electric fields or heat treatments. *European Food Research and Technology*, 228, (2008), p. 239-248.

[22] Ng A., Parker M.L., Parr A.J., Saunders P.K., Smith A.C., & Waldron K.W., Physicochemical Characteristics of Onion (*Allium cepa* L.) Tissues. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48, (2000), p. 5612-5617.

[23] Uyen, T., Clare, B., Guo, W., & Martinac, B., The effects of parabens on the mechanosensitive channels of *E. coli*. *European Biophysics Journal*, 2005, 34, p. 389-395.

[24] Fernandez, X., Chemat, F., and T.K.T. Do, *Les huiles essentielles – Vertus et Applications*, Ed. Vuibert, 2012.

[25] Garnero, J., Huiles essentielles. *Techniques de l'Ingénieur*, K345, 1996.

[26] Murphy Cowan, M., Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, (1999), 564-582.

[27] LV, F., Liang, H., Yuan, Q., and Li, C., In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*, 44, (2011), 3057-3064.

[28] Oyedemi, S.O., Okoh, A.I., Mabinya, L.V., Pirochenva, G. and Afolayan, A.J., The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol,  $\alpha$ -terpineol and  $\gamma$ -terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. *African Journal of Biotechnology*, 8, (2009), p. 1280-1286.

[29] White, B., Rice, L., and Howard, H.L., The procedure, principle, and instrumentation of antioxidant phytochemical analysis. *Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals*, Xu, Z.

- & Howard, L.R., Ed., John Wiley & Sons, (2012), p. 25-68.
- [30] M.A. Bolzinger, Extraits végétaux. *Actifs et Additifs en Cosmétologie*, M.-C. Martini & M. Seiller, 3<sup>e</sup> Edition, Ed. Lavoisier. (2006), p. 163-188.
- [31] A. Karagöz N. Doruöz, Z. Zeybek, A. Aslan, Antibacterial activity of some lichen extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, (2009), 3(12), p. 1034-1039.
- [32] Spigno, G., Donsì, F., Amendola, D., Sessa, M., Ferrari, G., and Marco De Faveri, D., Nanoencapsulation systems to improve solubility and antioxidant efficiency of a grape marc extract into hazelnut paste. *Journal of Food Engineering*, 114, (2013), 297-214.
- [33] Girotti-Chanu, C., Etude de la lipolyse et de la synthèse de composés du derme sous l'effet de la cirsimarine, flavone extraite de *Microtea debilis*. Thèse, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, (2006).
- [34] Dweck (A.C.), Natural Preservatives – An Update. *Formulating Natural Cosmetics*, Dweck (A.C.), Ed., Allured Books, (2010), p. 107-130.
- [35] Lopes (G.), Sousa (C.), Bernardo (J.), Andrade (P.B.), Valentão, Ferreres (F.), and Mouga (T.), Sterol profiles in 18 macroalgae of the portuguese coast. *Journal of Phycology*, 47, (2011), p. 1210-1218.
- [36] Genovese (G.), Tedone (L.), Hamann (M.T.), and Morabito (M.), The Mediterranean red alga *Asparagopsis*: A source of compounds against *Leishmania*. *Marine Drugs*, 7, (2009), p. 361-366.
- [37] Bloor, S.J., and Molloy, B.P.J., Cytotoxic norditerpene lactones from *Ileostylus Micranthus*. *Journal of Natural Products*, 54(5), (1991), p. 1326-1330.
- [38] Kubo, I., Muroi, H., and Himejima, M., Antibacterial activity of Totarol and its potentiation. *Journal of Natural Products*, 55(10), (1992), p. 1436-1440.
- [39] Zhang, M., Duan, C., Zang, Y., Huang, Z., and Liu, G., The flavonoid composition of flavedo and juice from the pummelo cultivar (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) and the grapefruit cultivar (*Citrus paradisi*) from China. *Food Chemistry*, 129, (2011), p. 1530-1536.
- [40] Ganzera, M., Aberham, A., and Stuppner, H., Development and validation of an HPLC/UV/MS method for simultaneous determination of 18 preservatives in *grapefruit seed* extract. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54, (2006), p. 3768-3772.
- [41] Shanga, X., Pana, H., Li, M., Miaoa, X., and Dingd, H., *Lonicera japonica* Thunb.: Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 138, (2011), p. 1-21.
- [42] Witkowska-Banaszczak, E., Bylka, W., Matławska, I., Gosłlinka, O., and Muszyński, Z., Antimicrobial activity of *Viola tricolor* herb. *Fitoterapia*, 76, (2005), p. 458-461.
- [43] Gülçin, İ., Oktay, M., Kireççi, E., Küfrevioğlu, Ö.İ., Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry*, 83, (2003), p. 371-382.
- [44] Depree, J.A., Howard T.M., and Savage G.P., Flavour and pharmaceutical properties

of the volatile sulphur compounds of Wasabi (*Wasabia japonica*). *Food Research International*, 31, (1999), p. 329-337.

[45] Faiveley M., L'eau et la conservation des aliments. Notions de biochimie alimentaire et alimentation humaine. *Techniques de l'Ingénieur*, F1011, (2003).

[46] Fernandez, X., Merck, F., & Kerdudo, A., Conservateurs pour cosmétiques – Généralités et conservateurs antimicrobiens. Formulation. *Techniques de l'ingénieur*, J2284, (2012).

[47] Kabara, J.J., Principles for Product Preservation. *Preservative-Free and Self-Preserving Cosmetics and Drugs: Principles and Practice*, Kabara J.J. & Orth D.S., Ed., Marcel Dekker. (1996), p. 1-14.

[48] Ryan, T., L'activité de l'eau, une autre façon de voir l'humidité. *Mesures Physiques*, 751, p. 38-41.

[49] Enigl, D.C., & Sorrells, K.M., Water Activity and Self-Preserving Formulas. *Preservative-Free and Self-Preserving Cosmetics and Drugs: Principles and Practice*, Kabara J.J. & Orth D.S., Ed., Marcel Dekker. (1996), p. 45-73.

[50] English, D.J., Factors in selecting and testing preservatives in product formulations. *Cosmetic and Drug Microbiology*, Orth D.S., Kabara J.J., Denyer S.P. & Tan S.K., Ed., Cosmetic Science and Technology Series, Vol. 31, (2006), p. 57-108.

[51] Varvaresou, A., Papageorgiou, S., Tsirivas, E., Protopapa, E., Kintziou, H., Kefala, V., & Demetzos, C., Self-preserving cosmetics, *International Journal of Cosmetic Science*, (2009), 31, p. 163-175.

[52] Orth, D.S., Acid pH and Survival Strategies of Microorganisms. *Preservative-Free and Self-Preserving Cosmetics and Drugs: Principles and Practice*, Kabara J.J. & Orth D.S., Ed., Marcel Dekker. (1996), p. 17-43.

[53] Romeo, F.V., Deluca, S., Piscopo, A., & Poiana, M., Antimicrobial effect of some Essential Oils. *Journal of Essential Oil Research*, (2008), 20, p. 373-379.

[54] Baratta, M.T., Dorman, H.J.D., Deans, S.G., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., & Ruberto, G., Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, (1998), 13, p. 235-244.

[55] Martini, M-C., Matières premières utilisées dans la formulation cosmétique des topiques cutanés. *Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie*, Martini, M-C., Ed., Lavoisier. (2003), p. 305-332.

[56] Spiess, E., Raw materials. *Chemistry and Technology of the Cosmetics and Toiletries Industry*, Williams, D.F., & Schmitt, W.H., Ed., Blackie Academic & Professional. (1992), p. 1-31.

[57] Larpent, C., Tensioactifs. Constantes physico-chimiques, *Techniques de l'Ingénieur*, K342, (1995).

- [58] Bognolo, G., Tensioactifs non ioniques – Mise en œuvre industrielle. Formulation, *Techniques de l'Ingénieur*, J2265, (2004).
- [59] Bognolo, G., Tensioactifs non ioniques – Propriétés : tableaux comparatifs. Formulation. *Techniques de l'Ingénieur*, J2266, (2004).
- [60] Patrone, V., Campana, R., Vittorio, E., & Baffone, W., In vitro synergistic activities of essential oils and surfactants in combination with cosmetic preservatives against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Current Microbiology*, 60, (2010), p. 237-241.
- [61] Hallsworth, J.E., Heim, S., & Timmis, K.N., Chaotropic solutes cause water stress in *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*, (2003), p. 1-11.
- [62] Ingram, L.O., Mechanism of Lysis of *Escherichia coli* by Ethanol and Other Chaotropic Agents. *Journal of Bacteriology*, 146(1), (1981), p. 331-336.
- [63] Cozzoli, O., The role of surfactants in self-preserving cosmetic formulas, *Preservative-Free and Self-Preserving Cosmetics and Drugs: Principles and Practice*, Kabara J.J. & Orth D.S., Ed., Marcel Dekker. (1996), p. 75-118.
- [64] Glover, R.E., Smith, R.R., Jones, M.V., Jackson, S.K., & Rowlands, C.C., An EPR investigation of surfactant action on bacterial membranes, *FEMS Microbiology Letters*, (1999), 177, p. 57-62.
- [65] Kabara, J.J., Hurdle technology for cosmetic and drug preservation. *Cosmetic and Drug Microbiology*, Orth D.S., Kabara J.J., Denyer S.P. & Tan S.K., Ed., Cosmetic Science and Technology Series, Vol. 31, (2006), p. 163-183.
- [66] Rauwel, G., Leclercq, L., Criquelion, J., Aubry, J.M., Nardello-Rataj, V., Aqueous mixtures of di-n-decyldimethyl-ammonium chloride/polyoxyethylene alkyl ether: dramatic influence of tail/tail and head/head interactions on co-micellization and biocidal activity. *Journal of Colloid Interface Science*, 374, (2012), p. 176-86.
- [67] Kabara, J.J., Fatty acids and esters as multifunctional components. *Preservative-Free and Self-Preserving Cosmetics and Drugs: Principles and Practice*, Kabara J.J. & Orth D.S., Ed., Marcel Dekker. (1996), p. 119-137.
- [68] Bergasson, G., Arnfinnsson, J., Steingrimsdottir, O., & Thormar, H., In vitro killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(11), (2001), p. 3209-12.
- [69] Conley, A.J., & Kabara, J.J., Antimicrobial action of esters of polyhydric alcohols. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 4(5), (1973), p. 501-506.
- [70] Kabara J.J., Swieczkowski, D.M., Coley, A.J., & Truant, J.P., Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2(1), (1972), p. 23-28.
- [71] Kato, N., & Shibasaki, I., Comparison of antimicrobial activities of fatty acids and their esters. *Journal of Fermentation Technology*, 53, (1975), p. 793.

- [72] Kabara J.J., Chelating agents as preservative potentiators. *Preservative-Free and Self-Preserving Cosmetics and Drugs: Principles and Practice*, Kabara J.J. & Orth D.S., Ed., Marcel Dekker. (1996), p. 209-226.
- [73] Orth, D.S., Lutes Anderson, C.M., Smith, D.K., & Milstein, S.R., Synergism of preservative system components: Use of the survival curve slope method to demonstrate anti-Pseudomonas synergy of methylparaben and acrylic acid homopolymer/copolymers in vitro. *Journal of Society of Cosmetic Chemists*, 40, (1989), p. 347-365.
- [74] Lambert, R.J.W., Hanlon, G.W., & Denyer, S.P., The synergistic effect of EDTA/antimicrobial combinations on *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Applied Microbiology*, 96, (2004), p. 244-253.
- [75] Nastro, A., Cannatelli, M.A., Morelli, I., Cioni, P.L., Bader, A., Marino, A., & Alonzo, V., Preservative properties of *Calamintha officinalis* essential oil with ant without EDTA, *Letters on Applied Microbiology*, 35, (2002), p. 385-389.
- [76] Alzoreky, N.S., & Nakahara, K., Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia, *International Journal of Food Microbiology*, 80, (2003), p. 223-230.
- [77] Xie, L., Hettiarachchy, N.S., Jane, M.E., & Johnson, M.G., Antimicrobial activity of Ginkgo biloba leaf extract on *Listeria monocytogenes*, *Journal of Food Science*, 68, (2003), p. 268-270.
- [78] INERIS, 2011. *Données technico-économiques sur les substances chimiques en France: EDTA ET SES SELS*, 49 p. (<http://rsde.ineris.fr/> ou <http://www.ineris.fr/substances/fr/> )
- [79] The boots Company plc. Anti- Microbial Compositions. *PCT World Patent* WO 91/11105, (1991).
- [80] Knoll Aktiengesellschaft. Enzyme concentrate. *PCT World Patent* WO 98/49272, (1998).
- [81] Ciccognani, D.T., Cosmetic preservation using enzymes. *Cosmetic and Drug Microbiology*, Orth D.S., Kabara J.J., Denyer S.P. & Tan S.K., Ed., Cosmetic Science and Technology Series, Vol. 31, (2006), p. 185-203.
- [82] Lopez, D., & Lopez, C., Cosmetic product sterilization, WO 2007/148022 A2.
- [83] Oulé, K.M., Dickman, M., & Arul, J., Microbicidal effect of pressurized CO<sub>2</sub> and the influence of sensitizing additives. *European Journal of Scientific Research*, 41(4), (2010), p. 569-581.
- [84] Spilimbergo, S., & Ciola, L., Supercritical CO<sub>2</sub> et NO<sub>2</sub> pasteurization of peach and kiwi juice. *International Journal of Food Science & Technology*, 45, (2010), p. 1619-1625.
- [85] Spilimbergo, S., Elvassore, N., & Bertucco, A., Microbial inactivation by High-pressure. *Journal of Supercritical Fluids*, 22, (2002), p. 55-63.

- [86] András, C.D., Csajági, C., Orbán, C.K., Albert, C., Ábrahám, B., & Miklóssy, I., A possible explanation of the germicide effect of carbon dioxide in supercritical state based on molecular biological evidence. *Medical Hypotheses*, 74, (2010), p. 325-329.
- [87] Spilimbergo, S., Mantoan, D., Quaranta, A., & Della-Mea, G., Real-time monitoring of cell membrane modification during supercritical CO<sub>2</sub> pasteurization. *The Journal of Supercritical Fluids*, 48, (2009), p. 93-97.
- [88] White, A., Burns, D., & Christensen, T.W., Effective terminal sterilization using supercritical carbon dioxide. *Journal of Biotechnology*, 123, (2006), p. 504-515.
- [89] Squinazi F., Analyses en microbiologie – Environnement microbien (air, surfaces, eau). Sécurité au laboratoire, *Techniques de l'Ingénieur*, P3355, (2006).
- [90] Fernandez, X., Merck, F., & Kerdudo, A., Conservateurs pour cosmétiques – Antioxydants et anti-UV. Formulation. *Techniques de l'ingénieur*, J2285, (2012).
- [91] Brannan D.K., The role of packaging in product preservation. *Preservative-Free and Self-Preserving Cosmetics and Drugs: Principles and Practice*, Kabara J.J. & Orth D.S., Ed., Marcel Dekker. 1996, p. 227-242.
- [92] English, D.J., Factors in selecting and testing preservatives in product formulations. *Cosmetic and Drug Microbiology*, Orth D.S., Kabara J.J., Denyer S.P. & Tan S.K., Ed., Cosmetic Science and Technology Series, Vol. 31, (2006), p. 57-108.
- [93] Yablonski J.I., & Mancuso, S.E., Microbial risks and eco-friendly packaging. *Formulating, Packaging and Marketing of Natural Cosmetic products*, Dayan N. & Kromidas L., Ed., Wiley, (2011), p. 179-211.
- [94] Martini, M-C., Matières premières utilisées dans la formulation cosmétique des topiques cutanés. *Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie*, MARTINI (M-C.), Ed., Lavoisier. (2003), p. 305-332.
- [95] Garrison, M., & Dayan, N., Formulating cosmetics with natural oils, fats, butters, and waxes. *Formulating, Packaging and Marketing of Natural Cosmetic products*, Dayan N. & Kromidas L., Ed., Wiley, (2011), p. 215-238.
- [96] Choe, E., & Min, D.B., Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8, (2009), p. 345-358.
- [97] Choe, E., & Min, D.B., – Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5, (2006), p. 169-186.
- [98] Brannan, D.K., Biology of microbes. *Cosmetic Microbiology : A practical approach*, GEIS (P.A.), Ed., 2<sup>nd</sup> Edition, Taylor & Francis, (2006), p. 19-69.
- [99] Porracchia, J.F., Microbiological limit testing: microbial specifications for finished products. *Cosmetic and Drug Microbiology*, Orth, D.S., Kabara, J.J., Denyer, S.P. et Tan, S.K., Éd., Cosmetic Science and Technology Series, 31, (2006), p. 233-242.
- [100] Roché, Y., and Niel, P., Analyses en microbiologie – Produits non stériles. *Techniques de l'Ingénieur*, P3352, (2006).

- [101] Brannan, D.K., Validation of methods. *Cosmetic Microbiology : A practical approach*, GEIS (P.A.), Ed., 2<sup>nd</sup> Edition, Taylor & Francis, (2006), p. 147-160.
- [102] Deladino, L., Anbinder, P.S., Navarro, A.S., & Martino, M.N., Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*, 71 (2008), 126-134.
- [103] Anbinder, P.S., Deladino, L., Navarro, A.S., Amalvy, J.I., & Martino, M.N. Yerba mate extract encapsulation with alginate and chitosan systems: interactions between active compound encapsulation polymers. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, 1 (2011), 80-87.
- [104] Gouin, S., Micro-encapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food & Technology*, 15, (2004), 330-347.
- [105] Benoît, J.P., et Richard, J., Microencapsulation. *Techniques de l'ingénieur*, J2210, (2000).
- [106] Green, B.K., & Sandberg R.W., Pressure Sensitive Record Materials, US Patent n° 2,548,364 (1951).
- [107] Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., & Desobry, S., Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science and Technologie*, 41 (2006), 1-21.
- [108] De Kruif, C.G., Weinbreck, F., & De Vries, R., Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9 (2004), 340-349.
- [109] De Vos, P., Faas, M.M., Spasojevic, M., & Sikkema, J., Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20 (2010), 292-302.
- [110] Stevanović, M., Savić, J., Jordović, B., & Uskoković, D., Fabrication, in vitro dégradation and the release behaviours of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanospheres containing ascorbic acid. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 59, (2007), p. 215-223.
- [111] Kwon, M.C., Choi, W.Y., Seo, Y.C., Kim J.S., Yoon, C.S., Lim, H.W., Kim, H.S., Ahn, J.H., & Lee, H.Y., Enhancement of the skin-protective activities of *Centella asiatica* L. Urban by a nano-encapsulation process. *Journal of Biotechnology*, 157, (2012), p. 100-106.
- [112] Numanoğlu, U., Şen, T., Tarimci, N., Kartal, M., Koo, O.M.Y., & Önyüksel, H., Use of cyclodextrins as a cosmetic delivery system for fragrance materials Linalool and Benzyl acetate. *AAPS Pharmaceutical & Science Technology*, 8(4), (2007), p. E1-E9.
- [113] Bernheim-Grosswasser, A., Ugazio, S., Gauffre, F., Viratelle, O., Mahy, P., et Roux, D., Spherulites : A new vesicular system with promising applications. An exemple : Enzyme microencapsulation. *Journal of Chemical Physics*, 112(7), (2000), 3424-3430.
- [114] Bouffieux O., Utilisation des modèles moléculaires numériques dans la recherche

industrielle pharmaceutique. *Travail de fin d'études. Bruxelles : Insitut Supérieur Industriel De Bruxelles*, (1995).

[115] Lidert, Z., Microencapsulation: an overview of the technology landscape. *Delivery System Handbook for Personal Care and Cosmetic Products*, Meyer R. R., Ed. William Andrew, (2005),p.181-190.

[116] Pi, P.H., Chen, J., Chen, K., Cai, Z.Q., Zheng, D.F., Wen, X.F., Cheng, J., and Yang Z.R., Effect of acid treatment on adhesive performance of encapsulated aluminium pigments on plastic sheets. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 90(5), (2012), 1224-1230.

[117] Rangappa, D., Ohara, S., Takami, S., Naka, T., Kondo, A., Ishii, M., Kobayashi, T., and Adschiri, T., Preparation of aqueous dispersible styrene-maleic amide encapsulated CoAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanocrystals using supercritical water flow type apparatus. *Materials Research Innovations*, 16(1), (2012), 30-37.

[118] Wallström E., Jespersen, H.T., and Schaumburg, K., A new concept for anti-fouling paint for yachts. *Progress in Organic Coatings*, 72, (2011), 109-114.

[119] Nordstierna, L., Abdalla A.A., Masuda, M., Skanemark, G., and Nydén M., Molecular release from painted surfaces: free and encapsulated biocides. *Progress in Organic Coatings*, 69, (2010), 45-48.

[120] Augustin M.A., Sanguansri L., Margetts C., Young B., Microencapsulation of food ingredients, *Food Australia*, 53, (2001), 220-223.

[121] Heinzen C., 2002. Microencapsulations solve time dependent problems for foodmakers, *European Food and Drink Review*, 3, (2002), 27-30.

[122] Nelson G., Application of microencapsulation in textiles, *International Journal of Pharmaceutics*, 242, (2002), 55-62.

[123] Voncina, B., Le Marechal, A.M., & Feczka, T., Encapsulation as green chemistry approach in Eco-dyeing/finishing. *Advanced Materials Research*, 441 (2012), 489-493.

[124] Markus A., Advances in the technology of controlled-release pesticide formulations. *Microencapsulations Methods and industrial applications*, S. Benita, Eds., Dekker, New York, 1996, 73-91

[125] Gonnet, M., Lethuaut, L., Boury, F., New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *Journal of Controlled Release*, 146 (2010), 276-290.

[126] Benoît, J-P., Richard, J., and Venier-Julienne, M-C., Microencapsulation, *Techniques de l'Ingénieur*, J2210, (2013).

[127] Whateley, T.L., Microcapsules : Preparation by interfacial polymerization and interfacial complexation and their applications. *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*, Benita, S., Ed. Marcel Dekker, (1996), 349-375.

[128] Mathiowitz, E., and Kreitz M.R., Microencapsulation. *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*, Mathiowitz, E., Ed. Jone Wiley & Sons, Inc., (1999), 493-546.



- [129] He, P., Conception et réalisation d'un système microfluidique pour la production de gouttes calibrées et leur encapsulation. Thèse, (2009), Université de technologie de Compiègne.
- [130] Yeo, Y., Baeck Namjin, and Park, K., Microencapsulation methods for delivery of protein drugs. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 6(4), (2001), 213-230.
- [131] Pavanetto, F., Conti, B., Genta, I., and Giunchedi, P., Solvent evaporation, solvent extraction and spray drying for polylactide microsphere preparation. *International Journal of Pharmaceutics*, 84(2), (1992), 151-159.
- [132] Wan, L.S.C., Heng, P.W.S., and Chia, C.G.H., Plasticizers and their effects on microencapsulation process by spray drying in an aqueous system. *Journal of Microencapsulation*, 9(1), (1992), 53-62.
- [133] Poncelet, D., Microencapsulation and cosmetics. *Science and applications of skin delivery systems*, Chap. 14, Wiechers, J.W., Ed. Allured Publishing Corporation, (2008), 251-267.
- [134] Re, M-I., Formulating drug delivery systems by spray drying. *Drying Technology*, 24(4), (2006), 433-446.
- [135] Ilić, I., Dreu, R., Burjac, M., Homar, M., Kerč, J., et Srčić, S., Microparticle size control and glimepiride microencapsulation using spray congealing technology. *International Journal of Pharmaceutics*, 381 (2009), 176-183.
- [136] Albertini, B., Mezzena, M., Passerini, N., Rodriguez, L., et Scalia S., Evaluation of spray congealing as technique for the preparation of highly loaded solid lipid microparticles containing the sunscreen agent, Avobenzone. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(8), (2009), 2759-2769.
- [137] Panda, R.C., Zank, J. & Martin, H., Modeling the droplet deposition behavior on a single particle in fluidized bed spray granulation process. *Powder Technology*, 115, (2001), 51-57.
- [138] Risch, S.J., Encapsulation: overview of uses and techniques. *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredient*, S.J. Risch & G.A. Reineccius, American Chemical Society, (1995), 2-7.
- [139] Knutson, B.L., Debenedetti, P.G., and Tom, J.W., Preparation of microparticulates using supercritical fluids. *Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines*, S.Cohen, & H. Bernstein, Ed. Marcel Dekker, (1996), 89-125.
- [140] Freitas, S., Merkle, H.P., et Gander, B., Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *Journal of Controlled Release*, 102 (2005), 313-332.
- [141] Elkharraz, K., Ahmed, A.R., Dashevsky, A., et Bodmeier, R., Encapsulation of water-soluble drugs by an o/o/o-solvent extraction microencapsulation method. *International Journal of Pharmaceutics*, 409 (2011), 89-95.

- [142] Vanderberg, G.W., Drolet, C., Scott, S.L., and De La Noüe, J., Factor affecting protein release from alginate-chitosan coacervate microcapsules during production and gastric/intestinal simulation. *Journal of Controlled Release*, 77 (2001), 297-307.
- [143] Burgess, D.J., and Hickey A.J., Microspheres technology and applications. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, J. Swarbrick & J.C. Boylan, Ed. Marcel Dekker, Vol. 10, (1994), 1-29.
- [144] Mofidi, N., Aghai-Moghadam, M., Sarbolouki, M.N., Mass preparation and characterization of alginate microspheres. *Process Biochemistry*, 35 (2000), 885-888.
- [145] Doelker, E., Mécanismes de libération des principes actifs à partir des microcapsules à action prolongée. *Labo-Pharma-Problèmes et Techniques*, 26(281), (1978), 915-922.
- [146] Saegusa, K., & Ishii, F., Triangular phase diagrams in the phospholipid-water-alcohol system for the preparation of lipid vesicles (liposomes) using the coacervation technique. *Langmuir*, 18 (2002), 5984-5988.
- [147] Ishii, F., Takamura, A., & Ishigami, Y., Procedure for preparation of lipid vesicles (liposomes) using the coacervation (phase separation) technique. *Langmuir*, 11 (1995), 483-486.
- [148] Junyaprasert, V., Mitrevej, A., Sinchaipanid, N., Boonme, P. & Wurster, D., Effect of procès variables on the microencapsulation of vitamin A palmitate by gelatin-acacia coacervation. *Drug Development & Industrial Pharmacy*, 27(6) (2001), 561.
- [149] Leimann, F.V., Gonçalves, O.H., Machado, R.A.F., & Bolzan, A., Antimicrobial activity of microencapsulated lemongrass essential oil and the effect of experimental parameters on microcapsules size and morphology. *Materials Science and Engineering C*, 29 (2009), 430-436.
- [150] Renard, D., Robert, P., Lavenant, L., Melcion, D., Popineau, Y., Guéguen, J., Duclairoir, C., Nakache, E., Sanchez, C. & Schmitt, C., Biopolymeric colloïdal carriers for encapsulation or controlled release applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 242(1-2) (2002), 163-166.
- [151] Weiß, G., Knoch, A., Laicher, A., Stanislaus, F., & Daniels, R., Simple coacervation of hydroxypropyl methylcellulose phtalate (HPMCP) – II. Microencapsulation of ibuprofen. *International Journal of Pharmaceutics*, 124 (1995), 97-105.
- [152] Boral, S., and Bohidar, H.B., Effect of ionic strength on surface-selective patch binding-induced phase separation and coacervation in similarly charged gelatin-agar molecular systems. *Journal of Physical Chemistry B*, 114 (2010), 12027-12035.
- [153] Hugerth, A., Caram-Lelham, N., & Sundelöf, L-O., The effect of charge density and conformation on the polyelectrolyte complex formation between carrageenan and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 34 (1997), 149-156.
- [154] Jégat, C., et Taverdet, J.L., Stirring speed influence study on the microencapsulation

process and on the drug release from microcapsules. *Polymer Bulletin*, 44 (2000), 345-351.

[155] Dong, Z., Ma, Y., Hayat, K., Chengsheng, J., Xia, S., & Zhang, X., Morphology and release profile of microcapsules encapsulating peppermint oil by complex coacervation. *Journal of Food Engineering*, 104 (2011), 455-460.

[156] Schmitt, C., Sanchez, C., Thomas, F., & Hardy, J., Complex coacervation between  $\beta$ -lactoglobulin and acacia gum in aqueous medium. *Food Hydrocolloids*, 13 (1999), 483-496.

[157] Ma, Z-H., Yu, D-G., Branfort-White, C.J., Nie, H-L., Fan, Z-X., & Zhu, L-M., Microencapsulation of tamoxifen: Application to cotton fabric. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 69 (2009), 85-90.

[158] Xiao, J-X., Yu, H-Y., & Yang, J., Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chemistry*, 125 (2011), 1267-1272.

[159] Callet, A., Administration orale d'insuline par double encapsulation : développement du système nanoparticulaire par coacervation complexe insuline/chitosane. Thèse, (2010), Université de Strasbourg.

[160] Poré, J., Émulsions et micro-émulsions. *Émulsions, micro-émulsions, émulsions multiples*, Ed. Techniques des Industries des Corps Gras, Chap. 4, (1992), p. 87-143.

[161] Wiechers, J.W., The influence of emulsion droplet size on cosmetic delivery. *Science and Application of Skin Delivery Systems*, J.W. Wiechers, Ed. Allured Global Information Leader, Chap.10, p. 171-203.

[162] Poré, J., Les émulsions multiples. *Émulsions, micro-émulsions, émulsions multiples*, Ed. Techniques des Industries des Corps Gras, Chap. 5, (1992), p. 145-172.

[163] Lasic, D.D., Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology*, 16(7), (1998), 307-321.

[164] Bangham, A.D. and Horne, R.W., Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of Molecular Biology*, 8, (1964), 660-668.

[165] Franzen, U., & Østergaard, J., Physico-chemical characterization of liposomes and drug substance-liposome interactions in pharmaceuticals using capillary electrophoresis and electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1267 (2012), 32-44.

[166] Storm, G. and Crommelin, J.A., Liposomes: quo vadis?. *PSTT*, 1(1), (1998), 19-31.

[167] Gomez-Hens, A. & Fernandez-Romero, J.M., Analytical methods for the control of liposomal delivery systems. *Trends in Analytical Chemistry*, 25(2), (2006), 167-178.

[168] Perrier, E., and Hart, J., Smart vectorization – Enzymatically activated encapsulation technologies. *Delivery System Handbook for Personal Care and Cosmetic*

*Products*, Meyer R. R., Ed. William Andrew, (2005), p.797-816.

[169] Lasic, D.D., Applications of Liposomes. *Handbook of Biological Physics*, Vol. 1, R. Lipowsky & E. Sackmann, Chap. 10, Ed. Elsevier Science B.V., 1995.

[170] Borrelli Marianne, Thèse – La microencapsulation des actifs cosmétiques. 2003, Faculté de Pharmacie de Marseille.

[171] Bangham, A.D., Standish, M.M., & Watkins, J.C., Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *Journal of Molecular Biology*, (1965), 13, p. 238-252.

[172] Lu, Q., Li, D-C., & Jiang, J-G., Preparation of a Tea polyphenol nanoliposome system and its physicochemical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2011), 59, p. 13004-13011.

[173] Castro-Roman, F., Porte, G., and Ligoure, C., Renormalization of Heldrich's interactions between fluid membranes in a lyotropic lamellar phase by addition of amphiphilic copolymers. *Physical Review Letters*, 82(1), (1999), 109-112.

[174] Gauffre, F., Roux, D., Studying a new type of surfactant aggregate ("Spherulites") as chemical microreactors. A first example: copper ion entrapping and particle synthesis. *Langmuir*, 15, (1999), 3738-3747.

[175] Roux, D, Diat, O., Procédé de préparation de micro-capsules ou de liposomes de tailles contrôlées. *WO93/19735*, (1993).

[176] A. PrévotEAU and C. Faure, *Trametes versicolor* laccase and multilamellar liposomes: effect of enzyme immobilization on its activity and stability, *Biochimie*, 94, (2012), p. 59-65.

[177] Olea, D., Viratelle and Faure, C., Polypyrrole-glucose oxidase biosensor: Effect of enzyme encapsulation in multilamellar vesicles on analytical properties. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(6), (2008), p. 788-794.

[178] Olea, D and Faure, C., Quantitative study of the encapsulation of glucose oxidase into multilamellar vesicles and its effect on enzyme activity. *The Journal of Chemical Physics*, 119(12), (2003), p. 6111-6118.

[179] Meyre, M-E., Clérac, R., Mornet, S., Duguet, E., Dole, F., Nallet, F., Lambert, O., Trépout, S., and Faure C., Multilamellar liposomes entrapping aminosilane-modified maghemite nanoparticles: "magnetionions". *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12, (2010), p. 12794-12801.

[180] Faure, C. Meyre, M.E., Trépout, S., Lambert, O., Lebraud, E., Magnetic multilamellar liposomes produced by *in situ* synthesis of iron oxide nanoparticles: "magnetionions". *The Journal of Physical Chemistry B*, 113, (2009), p. 8552-8559.

[181] Kim, D-W., Oh, S-G., Yi, S-C., Bae, S-Y., and Moon, S-K., Preparation of Indium-Tin Oxide Particles in Shear-Induced Multilamellar Vesicles (Spherulites) as Chemical Reactors. *Chemistry of Materials*, 12(4), (2000), p. 996-1002.

[182] Meyre, M.E., Lambert, O., Desbat, B., and Faure, C., Synthesis of stable, gold-particle

containing onion-type multilamellar vesicles. Influence of particle size on the onions' internal structure, *Nanotechnology*, 17, (2006), p. 1193-1201

[183] Redkar, M., Hassan, P.A., Aswald, V., and Devarajan, P., Onion phases of PEG-8 distearate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96(9), (2007), p. 2436-2445.

[184] Mignet, N., Brun, A., Degert, C., Delord, B., Roux, D., Hélène, C., Laversanne, E. and François, J-C., The spherulites™: a promising carrier for oligonucleotide delivery. *Nucleic Acids Research*, 28(16), (2000), p. 3134-3142.

[185] Chenevier, P., Delord, B., Amédée, J., Ichas, F., and Roux, D., RGD-functionalized spherulites™ as targeted vectors captured by adherent cultured cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1593(1), (2002), p. 17-27.

[186] Pott, T. and Roux, D., DNA intercalation in neutral multilamellar membranes. *FEBS Letters*, 511(1-3), p. 150-154.

[187] Freund, O. Mahy, P. Amedee, J., Roux, D, and Laversanne, D., Encapsulation of DNA in new multilamellar vesicles prepared by shearing a lyotropic lamellar phase. *Journal of Microencapsulation*, 17(2), (2000), p. 157-168.

[188] Zhang, P., Huang, Y., Makhov, A.M., Gao, X., Zhang, P., and, Li, S., Characterization of Spherulites as a Lipidic Carrier for Low and High Molecular Weight Agents. *Pharmaceutical Research*, 30(6), (2013), p. 1525-1535.

[189] Dhanikula, A.B., Lafleur, M., and Leroux, J-C., Characterization and in vitro evaluation of spherulites as sequestering vesicles with potential application in drug detoxification. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1758(11), (2006), P; 1787-1796.

[190] Douaihy, C., Koka, V., Mingotaud, C., and Gauffre, F., Tunable sustained release properties of “onion-like” phospholipids multilamellar vesicles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 303(1), (2006), p. 280-287.

[191] Bouter, A., Delord, B., Dransart, E., Poirier, C., Johannes, L., and Van Effenterre, D., Intracellular trafficking of Shiga-toxin-B-subunit-functionalized sphérulites. *Biology of the Cell*, 100(12), (2008), p. 717-728.

[192] Mahy, P., Delord, B., Amédée, J., freund, O., Roux, D., Laversane, R., Gaubert, S., and Kaiserlian, D., Antigen vectors in the form of multilamellar vesicles. WO 9916468 A1, (1999).

[193] Gauffre, F., and Roux, D., Evidence for a pH Difference Controlled by Thermodynamics between the Interior and the Exterior of a New Type of Vesicles in Suspension. *Langmuir*, 15(9), (1999), p. 3070-3077.

[194] Genty, M., Couarraze, G., Laversanne, R., Degert, C., Maccario, J., and Grossiord, J-L., Complex dispersions of multilamellar vesicles: a promising new carrier for controlled release and protection of encapsulated molecules. *Journal of Controlled Release*. 90(1), (2003), p. 119-133.

[195] Richard, A., Delvaux, J., and Bourel-Bonnet, L., Effects of sterilizing-grade filters on the physico-chemical properties of onion-like vesicles. *International Journal of Pharmaceutics*, 312(1-2), (2006), p. 144-150.

[196] Giunchedi, P., and Conte, U., Spray-drying as preparation method of

microparticulate drug delivery systems: an overview. *S.T.P. Pharma Sciences*, 5(4), (1995), p. 276-290.

[197] Santos, D.T. and Meireles, M.A.A., Micronization and Encapsulation of Functional Pigments Using Supercritical Carbon Dioxide, *Journal of Food Process Engineering*, 36(1), (2013), p. 36-49.

[198] Mezzomo, N., Paz, E., Maraschin, M., Martín, A., Cocero, M.J., and Ferreira, S.R.S., Supercritical anti-solvent precipitation of carotenoid fraction from pink shrimp residue: Effect of operational conditions on encapsulation efficiency. *The Journal of Supercritical Fluids*, 66, (2012), p. 342-249.

199

[200] Kulkarni, V.S., Liposomes in personal care products. *Delivery System Handbook for Personal Care and Cosmetic Products*, Meyer R. R., Ed. William Andrew, (2005), p.285-302.

[201] Christian, J.H.B., Reduced water activity, *Microbial Ecology of Foods. Vol1 : Factors affecting life and death of microorganisms*. Skinners et al., Eds Academic Press, (1980), 70-91.

[202] Dashnau, J.L., Nucci, N.V., Sharp, K.A., and Vanderkooi, J.M., Hydrogen bonding and the cryoprotective properties of glycerol/water mixtures. *Journal of Physical Chemistry B*, 110, (2006), 13670-13677.

[203] ACI Science, Glycerine: An overview. *The Soap and Detergent Association, Glycerine and Oleochemical division* (NY), (1990).

[204] Kwan, E., An introduction to hydrogen bonding, *Evans Group Seminar*, (2009).

[205] Dill, K.A., Truskett, T.M., Vlachy, V., and Hribar-Lee, B., Modeling water, the hydrophobic effect and ion solvation, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 34, (2005), p. 173-199.

[206] <http://www.franceagrimer.fr/content/download/18857/150800/file/5%20-%20Allerg%C3%A8nes.pdf> (consulté le 15/12/2013)

[207] [http://www.economie.gouv.fr/files/directions\\_services/dgccrf/manifestations/colloques/aromes\\_alimentaires/13\\_salle.pdf](http://www.economie.gouv.fr/files/directions_services/dgccrf/manifestations/colloques/aromes_alimentaires/13_salle.pdf) (consulté le 15/12/2013)

[208] BEP140143EP

[209] Orlowska S., Conception et prédiction des caractéristiques diélectriques des matériaux composites à deux et trois phases par la modélisation et la validation expérimentale. *Thèse*. Ecole Centrale de Lyon, (2003).

[210] Wohlfarth, C., Permittivity (dielectric constant) of liquid, *Handbook of Chemistry and Physics*, p.6-132-6-153.

[211] Piekara, M.A., Sur la relation entre la constante dielectrique des emulsions, la concentration volumétrique de la phase dispersée et le degré de dispersion. *Journal de Physique*, 10, p. 360-369.

- [212] [http://www.duponttateandlyle.com/zemea\\_cosmetic\\_ingredients](http://www.duponttateandlyle.com/zemea_cosmetic_ingredients) (consulté le 04/04/2012)
- [213] Kunlayakorn, L., Kanlayavattanakul, M., and Lourith, N., Antimicrobial efficacy of caprylyl glycol and ethylhexylglycerine in emulsion. *Journal of Health Research*, 23(1), (2009), p. 1-3.
- [214] Steinberg, D.C., Preservatives: a categorical examination. *Preservatives for Cosmetics*, Third Edition, Kozlowski, A.C. & Budzynski, B.W., Ed. Allured Books, (2012), p. 21-132.
- [215] Personal care magazine, 11/2011, <http://www.personalcaremagazine.com/Print.aspx?Story=9024>, (consulté le 08/02/2014).
- [216] Reich, E., and Schibli, A., High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants. Ed. Thieme, (2007), p. 233-237.
- [ccxvii] Dayan, N., Delivery system design in topically applied formulations: an overview. *Delivery System Handbook for Personal Care and Cosmetic Products*, Meyer R. R., Ed. William Andrew, (2005), p.101-118.
- [ccxviii] Hawkins, S., Wolf, M., Guyard, G., Greenberg, S., and Dayan, N., Microcapsules as a delivery system. *Delivery System Handbook for Personal Care and Cosmetic Products*, Meyer R. R., Ed. William Andrew, (2005), p.191-214.
- [219] Kanouni, M., and Rosano, H.L., Preparation of stable multiple emulsions as delivery vehicles for consumer care products – study of the factors affecting the stability of the system ( $w_1/o/w_2$ ). *Delivery System Handbook for Personal Care and Cosmetic Products*, Meyer R. R., Ed. William Andrew, (2005), p.472-478.
- [220] Fundueanu, G., Esposito, E., Mihai, D., Carpov, A., Desbrieres, J., Rinaudo, M., and Nastruzzi, C., Preparation and characterization of Ca-alginate microspheres by a new emulsification method. *International Journal of Pharmaceutics*, 170, (1998), p. 11-21.
- [221] O. Diat, and D. Roux, Preparation of monodisperse multilayer vesicles of controlled size and high encapsulation ratio, *Journal of Physics II*, 3, (1993), p. 9-14.
- [222] P. Sierro, and D. Roux, Structure of Lyotropic Lamellar Phase Under Shear, *Physical Review Letters*, 78(8), (1997), p. 1496-1499.
- [223] D. Roux, C. Degert, and R. Laversanne, Encapsulation de composés à usage alimentaire par des tensioactifs, FR2735658A-1, (1995).
- [224] Faure, C. Meyre, M.E., Trépout, S., Lambert, O., Lebraud, E., Magnetic multilamellar liposomes produced by *in situ* synthesis of iron oxide nanoparticles: “magnetoliposomes”. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113, (2009), p. 8552-8559.
- [225] F. Sansone, P. Picerno, T. Mencherini, F. Villecco, A.M. D’Ursi, R.P. Aquino, M.R. Lauro, Flavonoids microparticles by spray-drying: Influence of enhancers of the dissolution rate on properties and stability, *Journal of Food Engineering*, 103, (2011), p.

188-196.

[226] N. Nateem, and K. MD, Antimicrobial and anti-oxidant properties of the isolated compounds from the methanolic extract from the leaves of *Tectona grandis*, *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 2(4), (2011), p. 163-165.

[227] P. Lacopini, M. Baldi, P. Storchi, and L. Sebastiani, Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape : Content, in vitrop antioxidant activity and interactions, *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, (2008), p. 589-598.

[228] I.N. Abreu, A.L.M. Porto, A.J. Marsaioli, and P. Mazzafera, Distribution of bioactive substances from *Hypericum brasiliense* during plant growth, *Plant Science*, 167, (2004), p. 949-954.

[229] Lauro, M.R., Torre, M.L., Maggi, L., De Simone, F., Conte, U., and Aquino, R.P., Fast- and slow-release tablets for oral administration of flavonoids : Rutin and Quercetin, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28(4), (2002), p.371-379.

[230] Tommasini, S., Calabrò, M.L., Raneri, D., Ficarra, P., and Ficarra, R., Combined effect of pH and polysorbates with cyclodextrins on solubilization of naringenin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36, (2004), p. 327-333.

[231] [www.r-nano.fr](http://www.r-nano.fr) (consulté le 10 mai 2013)

[232] COSMED – Les obligations réglementaires des nanomatériaux (France- Europe – International). *Les guides pratiques des entreprises*, (2013).

[233] <http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/index.htm> (consulté le 10 mai 2013)

[234] <http://www.cosmed.fr> (consulté le 10 mai 2013)

[235] Colipa, The European Cosmetics Association, Guidance interpretation of the definition of the term « Nanomaterial » according to the EU Cosmetic Regulation 1223/2009, (2012).

[236] <https://cosmeticseurope.eu/index.php> (consulté le 23 août 2013)

[237] Yamamoto, E., Hyodo, K., Ohnishi, N., Suzuki, T., Ishihara, H., Kikuchi, H., and Asakawa, N., Direct, simultaneous measurement of liposome-encapsulated and released drugs in plasma by on-line SPE-SPE-HPLC. *Journal of Chromatography B*, 879, (2011), p. 3620-3625.

[238] Meyre, M-E., Clérac, R., Mornet, S., Duguet, E., Dole, F., Nallet, F., Lambert, O., Trépout, S., and Faure C., Multilamellar liposomes entrapping aminosilane-modified maghemite nanoparticles: “magnetionions”. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12, (2010), p. 12794-12801.

[239] Bellott, R., Pouna, P., and Robert, J., Separation and determination of liposoma and non-liposomal daunorubicin from the plasma of patients treated with Daunoxome. *Journal of Chromatography B*, 757, (2001), p. 257-267.



- [240] Van Dijk, C, Driessen, A.J. Recourt, K., The uncoupling efficiency and affinity of flavonoids for vesicles, *Biochemical Pharmacology*, 60, (2000), p. 1593–1600.
- [241] Pawlikowska-Pawlega, B., Misiak, L.E., Zarzyka, B., Paduch, R. Gawron, A., and Gruszecki, Wl., TIR, <sup>1</sup>H NMR and EPR spectroscopy studies on the interaction of flavone apigenin with dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes, *Biochimica Biophysica Acta* 828(2), (2013), p. 518-527.
- [242] Park, S.N., Lee, M.H., Kim, S.J., and Yu, E.R., reparation of quercetin and rutin-loaded ceramide liposomes and drug-releasing effect in liposomes-in-hydrogel complex system, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 435(3), (2013), p. 361-366.
- [243] Goniotaki, M., Hatziantoniou, S., Dimas, K., Wagner, M., Demetzos, C., Encapsulation of naturally occurring flavonoids into liposomes: physicochemical properties and biological activity against human cancer cell lines, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56(10), (2004), p. 1217-1224.
- [244] Kilfoyle, B.E., Kaushik, D., Terebetski, J.L., Bose, S. and Mishniak-Kohn, B.B., The use in quercetin and curcumin in skin care consumer products. Microbial risks and eco-friendly packaging. *Formulating, Packaging and Marketing of Natural Cosmetic products*, Dayan N. & Kromidas L., Ed., Wiley, (2011), p. 259-287.
- [245] Huang, D., Ou, Boxin, and Prior, R.L., The chemistry behind antioxidant capacity assays, *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, (2005), p. 1841-1856.
- [246] Manjunath, M., Lavanya, G., Sivajyothi, R., & Reddy, O. V. S., Antioxidant and radical scavenging activity of *Actiniopteris radiata* (Sw.) link. *Asian Journal of Experimental Sciences*, 25(1), (2011) p. 73- 80.
- [247] Yang, J., Guo, J., & Yuan, J., In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT - Food Science and Technology*, 41(6), (2008), p. 1060- 1066.
- [248] Kerdudo, A., Dingas, A., Fernandez, X and Faure, C., Encapsulation of rutin and naringenin in multilamellar vesicles for optimum antioxidant activity. *Food Chemistry*, 159, (2014), p. 12-19.
- [249] Noyes, A.A., Chapin, E.S., The solubility of acids in solutions of the salts of other acids. *Journal of the American Chemical Society*, 20(10), (1898), p. 751-756.
- [250] Handbook of Chemistry and Physics, 52<sup>nd</sup> Edition, Weast, R.C., Ed. The Chemical Rubber Co., 1971-1972, C-185.
- [251] Ardhammar, M., Lincoln, P., and Nordén, B., Invisible liposomes: refractive index matching with sucrose enables flow dichroism assessment of peptide orientation in lipid vesicle membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24), (2002), p. 15313-15317.
- [252] Jin, Y.L., Chen, J.Y., Xu, L., and Wang, P.N., Refractive index measurement for biomaterial samples by total internal reflection. *Physics in Medicine and Biology*, 51,

(2006), p. 371-379.

## COMMUNICATIONS ORALES ET ECRITES

---

### **Communications orales :**

A. Kerdudo, A. Dingas, C. Faure, X. Fernandez, *Development of Natural Preservatives Extracts – Natural Actives Vectorization*. FORMULA VII, Mulhouse, 1-4 juillet 2013.

A. Kerdudo, A. Dingas, C. Faure, X. Fernandez, *Les polyphénols : agents de protection et/ou actifs cosmétiques*. 32<sup>èmes</sup> Journées Internationales des Huiles Essentielles et Extraits, Digne-les-Bains, 18-20 septembre 2013.

### **Communications par affiches :**

A. Kerdudo, F. Merck, X. Fernandez, A. Dingas, Y. Rolland, *La biodiversité végétale méditerranéenne: source de nouveaux conservateurs naturels pour la cosmétique*. 30<sup>èmes</sup> Journées Internationales des Huiles Essentielles et Extraits, Digne-les-Bains, 6-8 septembre 2011.

A. Kerdudo, A. Dingas, C. Faure, X. Fernandez, *Multilamellar encapsulation of Rutin and Naringenin – Application on natural preservatives extracts*. Colloque des doctorants, Nice, 15 mai 2012.

A. Kerdudo, A. Dingas, C. Faure, X. Fernandez, *Encapsulation of Natural Preservative Extracts Multilamellar vesicles development*. 31<sup>èmes</sup> Journées Internationales des Huiles Essentielles et Extraits, Digne-les-Bains, 20-22 septembre 2012.

### **Brevet**

Brevet déposé : BEP140143EP

### **Articles publiés :**

Kerdudo, A., Dingas, A., Fernandez, X and Faure, C., Encapsulation of rutin and naringenin in multilamellar vesicles for optimum antioxidant activity. *Food Chemistry*, 159, (2014), p. 12-19.

X. Fernandez, F. Merck, A. Kerdudo, *Conservateurs pour les cosmétiques – Généralités et conservateurs antimicrobiens*. J2284, Formulation, Techniques de l'Ingénieur (2012).

X. Fernandez, F. Merck, A. Kerdudo, *Conservateurs pour les cosmétiques – Antioxydants et anti-UV*. J2285, Formulation, Techniques de l'Ingénieur (2012).



## Encapsulation of rutin and naringenin in multilamellar vesicles for optimum antioxidant activity



Audrey Kerdudo<sup>a,b</sup>, Alexandre Dingas<sup>a</sup>, Xavier Fernandez<sup>b</sup>, Chrystel Faure<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> S.O.F.I.A. Cosmétiques, 1ère Avenue, 1ère Rue, 06514 Carros, France

<sup>b</sup> Université Nice Sophia Antipolis, ICN, UMR 7272, Parc Valrose, 06108 Nice CEDEX 2, France

<sup>c</sup> Laboratoire de Chimie et Biologie des Membranes et Nano-objets, Univ. Bordeaux, CBMN, UMR 5248, Allée Geoffroy St. Hilaire, F-33600 Pessac, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 29 November 2013

Received in revised form 14 February 2014

Accepted 1 March 2014

Available online 12 March 2014

#### Keywords:

Encapsulation

Antioxidant activity

Flavonoids

Multilamellar vesicles

### ABSTRACT

Rutin and naringenin, two phenolic compounds with antioxidant properties were encapsulated in lipid-based onion-type multilamellar vesicles (MLVs). After vesicles formation, the free, adsorbed/encapsulated analytes were well separated with size exclusion chromatography (SEC), and rutin and naringenin were quantified with UV-HPLC at 258 nm and 290 nm. A mathematical model was developed to separately calculate the encapsulation and the adsorption yields of both phenols. Naringenin was shown to be poorly encapsulated (<10%) but highly adsorbed on MLVs surface (>60%) whatever MLVs composition. Conversely, rutin showed high encapsulation efficiency (>60%). Entrapment of rutin was proved to be efficient since no leak was observed within 30 days in concentrated MLVs phase, while  $16.0 \pm 0.3\%$  of rutin was still encapsulated after 30 days when MLVs were diluted in water. Free rutin broke up into quercetin while the encapsulated one remained stable. DPPH assay confirmed that only free and adsorbed rutin participated in antioxidant activity.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The human body suffers from oxidative stress due to high exposure to sunlight, pollution, daily stress, unbalanced diet or smoke (Rovito & Oblong, 2013). It is commonly accepted that oxidative stress causes excessive production of reactive oxygen species (ROS) (Cheng et al., 2013) and is associated with the origin of some human diseases including cancer and aging (Chen, Lin, & Hsieh, 2007). Some studies have shown that a diet rich in polyphenolic compounds can help to fight against ROS production due to their antioxidant activity (Yen et al., 2013). Such compounds are also used for their antioxidant properties to enhance the shelf life of food products that can suffer from UV radiation, temperature or oxygen contact (Myers, Fuller, & Yang, 2013). This use of antioxidants assumes a decrease of their concentration before food consumption. In order to preserve the bioavailability of natural antioxidants for an optimised activity in the human body, it is possible to protect them using encapsulation systems (Takahashi, Uechi, Takara, Asikin, & Wada, 2009).

Natural extracts are known to have antimicrobial and/or antioxidant properties (Kabara & Orth, 1997). Some of them have been studied for food protection or to fight ROS production, such as

tea tree or curcumin (Takahashi et al., 2009; Yen et al., 2013). Especially, phenolic compounds, such as flavonoids, are widespread in vegetables and known to confer antioxidant (Fernandez, Merck, & Kerdudo, 2012), anti-inflammatory (Pelzer, Guardia, Juarez, & Guerreiro, 1998), antibacterial (Cushnie & Lamb, 2011), antiviral, and antifungal (Orhan, Özcelik, Özgen, & Ergun, 2010) properties. But, as the biological activity of natural compounds, such as flavonoids, can be affected by physico-chemical factors (light, heat, oxygen, humidity), various encapsulation methods have been developed to confer them protection and thus to enhance their activity *in situ*. Encapsulation is also a possible solution to preserve the antioxidant activity of molecules until consumption, to insure an extended life-span, or to avoid unpleasant taste of high concentration of some molecules (astringency, bitterness) (McClements, 2010).

Two flavonoids were chosen here to develop an encapsulation system: naringenin and rutin. These molecules were chosen because of their different polarity (See Supplemental information, S1); quercetin, which is the aglycon form of rutin was not used as it is not stable in our conditions. Naringenin is the predominant flavanone in grapefruit (Sansone et al., 2011) whereas rutin is a common flavonol glycoside of vegetables (Iacopini, Baldi, Storch, & Sebastiani, 2008). Both display antioxidant and antimicrobial activities. Rutin was successfully encapsulated using ionotropic gelation (Jantrawut, Assifaoui, & Chambin, 2013), in chitosan

\* Corresponding author. Tel.: +33 540006833.

E-mail address: [chrystel.faure@enscbp.fr](mailto:chrystel.faure@enscbp.fr) (C. Faure).

particles (Konecni, Low, & Nickerson, 2012), in multiple emulsions (Akhtar, Murray, Afeisume, & Khew, 2014), and in polymer nanocapsules (Almeida et al., 2010). Less amount of work has been carried out with naringenin: it was encapsulated using cyclodextrin complexation (Hădărugă, Hădărugă, Bandur, & Isengard, 2012), and also by spray drying, making gastroresistant microparticles (Lauro, Maggi, Conte, De, & Aquino, 2005; Lauro, De, Sansone, Iannelli, & Aquino, 2007; Sansone et al., 2011).

As protecting and delivery systems, liposomes (lipid-based vesicles) display many advantages; biocompatibility, non-toxicity, adjustable size, enhancement of molecules chemical and physical stability (Müller, Petersen, Hommoss, & Pardeike, 2007), ability to encapsulate hydrophobic and hydrophilic molecules (Charrois & Allen, 2003), and controlled delivery (Maherani, Arab-Tehrany, Kheirulomoom, Geny, & Linder, 2013). However, liposomes are usually produced by the hydration of a dried lipid film with an aqueous phase in excess. This process requires the use of organic solvents. Moreover, encapsulation yields are often limited. Onion-type multilamellar vesicles are obtained with an easier process, consisting in shearing a swollen lamellar phase leading to the formation of controlled, reproducible, multilamellar vesicles, the so-called onions (Diat & Roux, 1993). Onions display the same advantages as unilamellar liposomes but their production does not require organic solvents (Roux, Degert, & Laversanne, 1996). Moreover, they were shown to encapsulate biomolecules with high encapsulation efficiency (Mignet, 2000; Olea & Faure, 2003; Dhanikula, Lafleur, & Leroux, 2006; PrévotEAU & Faure, 2012).

This study investigates the encapsulation of naringenin and rutin in onion-type MLVs. The aim of this work is to optimise a protective and delivery system with model molecules before the encapsulation of a natural extract.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Rutin hydrate ( $\geq 94\%$ ) and naringenin ( $\geq 98\%$ ) were purchased from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Emulmetik 930 (E930, a 95% purified phosphatidylcholine isolated from soybean lecithin, containing less than 1% of lysophosphatidylcholine) was obtained from Unipex (Saint-Ouen L'Aumône, France). Glycerin 99.5% and propylene glycol (PG) were purchased from Interchimie (Bobigny, France). Solvents (water, acetonitrile and 2-propanol) were from HPLC grade, used with 0.1% of formic acid and purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) for HPLC study. Triton X100 was purchased from Sodipros (Echirolles, France).

### 2.2. Preparation of onion-type multi-lamellar vesicles

The general preparation of onion-type multilamellar vesicles (MLVs) was described in details elsewhere (Roux et al., 1996). Flavonoids were first dissolved in 2–4 mL of 60:40 v/v glycerin: propylene glycol mixture (GPG). For rutin and naringenin concentrations below 30 mg/mL of GPG and 8 mg/mL of GPG, respectively, dissolution was performed in mild conditions (magnetic mixing at 40 °C). For higher concentrations, dissolution required the use of an ultra-sound bath (from 30 to 90 min) (Fisher Scientific FB15049, Germany). A lamellar phase was prepared by mixing Emulmetik 930 (c.a. 250 mg) with the flavonoid-GPG solution in a given weight proportion (from 55/45 to 15/85 (w%/w%)). Mixing was performed with a micro-spatula for 3–4 min in a 4 mL vial. The tube was centrifuged at 4000 rpm for 5 min (Sigma 2–6, Germany). Shearing was then resumed followed by further centrifugation. The cycle was repeated 3 times until the resultant yellow/brown

lamellar phase appeared homogeneous. “Empty” onions (blank onions) were prepared with lipid and GPG containing no flavonoid. Once sheared, onions were in close contact forming a compact phase. They were then dispersed in distilled water (25 mg onions/mL, unless specified) by gentle mixing with a mechanical stirrer (500 rpm) for 3 h.

### 2.3. Optical microscopy

MLVs were observed with an Optech microscope using 40X and 100X objectives. The former objective was supplied with a phase contrast filter.

### 2.4. Particle size analysis

Vesicle size was measured using a Mastersizer 2000S (Malvern Instruments), with a measure scale from 20 nm to 2 mm. Four measurements were performed per sample.

### 2.5. Size exclusion chromatography (SEC)

SEC was performed to separate MLVs from free flavonoids in order to measure both the encapsulation and adsorption percentages. An open microcolumn (1 × 8 cm) filled with a Sephacryl S300HR gel (Sigma Adrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was used. The column flow, which was about 1 mL/min, was controlled and kept constant by fixing the vertical position of the eluent pool (distilled water).

In order to determine the elution profile of free (non-entrapped) flavonoid, a mixture (400 µL) of rutin and naringenin was deposited onto the column gel. To do this mixture, rutin and naringenin were first both diluted in GPG at 30 mg/mL and 8 mg/mL, respectively, and then diluted in water (\*100). 0.5–1 mL fractions were collected and a total volume of 60 mL was eluted. Each collected fraction was analysed using UV-HPLC at 258 and 290 nm for rutin and naringenin, respectively. The elution volume ( $V_e$ ) ranged from 6 to 25 mL, and 15 to 40 mL for rutin and naringenin, respectively. Total amount of analytes was eluted.

The MLVs elution volume was determined using MLVs containing both rutin (30 mg/mL of GPG) and naringenin (8 mg/mL of GPG). SEC column was initially saturated with 400 µL of blank MLVs and washed with distilled water. MLVs (25 mg/mL of water) were found to elute between 1.5 and 5 mL.

To determine the amount of adsorbed and encapsulated flavonoids, flavonoid-containing MLVs were separated from the dispersing medium by SEC, and the MLVs-containing fractions (10 mg) were treated with 20 w% Triton X-100 (80 µL) to destroy MLVs for HPLC convenience. The measured flavonoid concentration corresponds to the fraction of flavonoid adsorbed on and encapsulated in MLVs.

To determine the amount of adsorbed flavonoids on MLVs, blank MLVs were dispersed in an “aqueous” solution containing either naringenin or rutin, or both flavonoids. This solution was prepared as described previously: flavonoid-GPG solution was diluted in water to get a final concentration in flavonoid similar to the dispersions of flavonoid-loaded MLVs. SEC was performed to separate MLVs from the dispersing medium. MLVs fractions were then treated with Triton X-100. The measured flavonoid concentration corresponds to the fraction of flavonoid adsorbed on MLVs surface.

### 2.6. High performance liquid chromatography (HPLC)

HPLC analyses were performed using an Agilent 1200 system (Courtaboeuf, France), equipped with a quaternary solvent delivery system, an autosampler, a degasser and a DAD (Diode-Array

Detection) detector. Separation was performed using a Luna C18 column (Phenomenex,  $250 \times 4.6$  mm;  $5 \mu\text{m}$ ). Rutin was detected at 258 nm with a retention time ( $T_R$ ) of 13.1 min while naringenin was detected at 290 nm with a  $T_R$  of 18.3 min. Calibration curves for both molecules were obtained after dissolving each one in 2–3 mL GPG to get a 30 mg/mL and 8 mg/mL concentration in rutin and naringenin, respectively. Subsequent dilutions in water were then performed to get concentrations ranging from 0.2 to 100  $\mu\text{g/mL}$ , and 0.05 to 26.46  $\mu\text{g/mL}$  for rutin and naringenin, respectively. Response factors were determined by linear regression for each standard with  $R^2$  coefficients all deemed acceptable above 0.99.

The column was eluted with a flow rate of 1.0 mL/min, and the composition of the mobile phase consisted of 0.1% acid formic acidified water (A), acetonitrile (B) and 2-propanol (C). Gradient conditions were as follows: 0–5 min, 5% B; 5–20 min, 5–62% B; 20–21 min, 100% B; 21–23 min, 100–5% B. To assay rutin and naringenin adsorbed or/and encapsulated into MLVs, SEC fractions containing MLVs (10 mg) were treated with 20 w% Triton X100 (80  $\mu\text{L}$ ) to destroy them. For samples containing E930 and/or Triton X100, an additional gradient was applied as follows: 23–28 min, 60% B and 40% C; 28–33 min, 60% B and 40% C; 33–35 min, 5% B. Injection volume was 30  $\mu\text{L}$ .

## 2.7. DPPH radical-scavenging activity

The antioxidant activity of the samples was determined using the known scavenging effect of DPPH free radical. Classically, DPPH is dissolved in methanol and its assay is performed at 517 nm (Sharma & Bhat, 2009; Manjunath, Lavanya, Sivajyothi, & Reddy, 2011). In our case, a 0.6 mM DPPH solution was first prepared in MeOH/water 75:25 v/v. Rutin was dissolved in GPG (25 mg/mL GPG) and then diluted in water to get a rutin final concentration ranging from 0.5  $\mu\text{g/mL}$  to 16  $\mu\text{g/mL}$ . 0.25 mL DPPH solution was then added to 1.750 mL of rutin solution. Two peaks were visible in UV spectra located at 517 nm and 700 nm with these solvents. The DPPH activity was measured at 700 nm for both systems (rutin solution and rutin-containing MLVs) since sensitivity was better at this wavelength. For studies on MLVs, 0.25 mL DPPH (0.6 mM) was mixed with 1.750 mL of MLVs dispersion. MLVs were prepared using rutin dissolved in GPG (25 mg rutin/mL GPG). The rutin concentration was then varied by changing the MLVs concentration. The absorbance at 700 nm was determined after 40 min incubation at room temperature in the dark. Inhibition activity was calculated in the following way:

$$I(\%) = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

where  $A_0$  is the absorbance of the control (samples with DPPH but no rutin),  $A_1$  is the absorbance of rutin. For each measurement, a blank with solvents only was used. All tests were carried out in triplicate.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Vesicles characterisation

The validation of onion-type multilamellar vesicles formation was performed by optical microscopy. Onions were imaged while some unilamellar liposomes were also present but in negligible amount. The onions' sizes were smaller than  $0.5 \mu\text{m}$  as estimated by this method (see Supplemental information, S12).

To better characterise their size, laser light scattering was performed and the influence of replacing water by GPG (60:40 v/v) in onion composition was also evaluated. As detailed in Section 2, naringenin and rutin were solubilised in GPG since they were

poorly soluble in water. The substitution of water by GPG (without any flavonoid) leads to both a decrease of vesicles size and of size dispersion (see Supplemental information, S13). The diameter of vesicles ranged from 0.4 to  $20 \mu\text{m}$ , and from 0.1 to  $2 \mu\text{m}$  when vesicles were prepared with water and GPG, respectively. The addition of rutin and naringenin in GPG did not have any significant impact on MLVs size (maximum volume distribution at  $0.48 \mu\text{m}$ ).

Another MLVs composition was also studied since it revealed to be optimised for rutin encapsulation (see Section 3.3.3): 33/67 (w%/w%) (E930/rutin-GPG) instead of 55/45 (w%/w%). For this optimised composition, MLVs were smaller: their diameter ranged from 60 to 500 nm with a mean size at 160 nm (see S13). It must be noted that only the biggest ones could then be imaged by optical microscopy (300 nm is the resolution limit).

### 3.2. Adsorption of rutin and naringenin on vesicle surface

Onion-type MLVs have been largely studied for their encapsulation ability. In some cases, such as proteins (PrévotEAU & Faure, 2012), adsorption of non-encapsulated molecules on onion surface was reported. Moreover, Van Dijk et al. demonstrated that flavonoids have a strong affinity for vesicle surface (Van Dijk, Driessen, & Recourt, 2000). We first evaluated whether adsorption of naringenin and rutin on MLVs surface could occur using the method described in Section 2.5. The yield of adsorbed actives is defined as:

$$\%A = \frac{m_A}{m_F + m_A} \times 100 \quad (2)$$

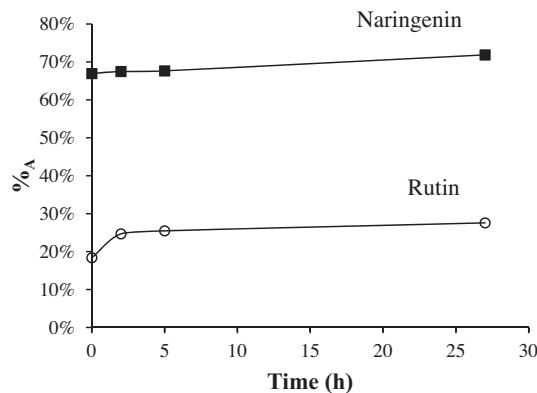
where  $m_A$  is the mass of rutin or naringenin adsorbed on MLVs surface and measured in the MLVs fractions after Triton X100 disruption, and  $m_F$  is the mass of free (i.e. non-adsorbed) rutin or naringenin.  $m_F + m_A$  is measured in all SEC fractions.

Blank MLVs were dispersed in an aqueous solution of rutin (289  $\mu\text{g/mL}$ ) and naringenin (77  $\mu\text{g/mL}$ ). HPLC revealed adsorption of both flavonoids from 10 min of incubation with MLVs:  $17.9 \pm 6\%$  and  $65.6 \pm 1.9\%$  for rutin and naringenin respectively (Fig. 1). Rutin adsorption increased during the two first hours and then stabilized at 28%. Naringenin adsorption was almost maximal from 10 min dispersion. The MLVs dispersion time was then fixed to 3 h to ensure a complete and stable adsorption of flavonoids on MLVs before measuring encapsulation and adsorption yields.

### 3.3. Encapsulation of rutin and naringenin in MLVs

#### 3.3.1. Expression of the encapsulation yield

As significant adsorption was measured on MLVs surface, experiments were performed to distinguish adsorption onto the



**Fig. 1.** Adsorption percentage (%A) of rutin (289  $\mu\text{g/mL}$ ) and naringenin (77  $\mu\text{g/mL}$ ) on blank MLVs in function of incubation time. Naringenin adsorption is much higher than rutin one.



MLVs surface from encapsulation inside MLVs, and to calculate the corresponding yield.

The percentage of encapsulated and adsorbed rutin or naringenin is defined by the following equation:

$$\%_{E+A} = \frac{m_{E+A}}{m_F + m_A + m_E} \times 100 = \frac{m_{E+A}}{m_F + m_{E+A}} \times 100 \quad (3)$$

where  $m_{E+A}$  is the mass of rutin or naringenin encapsulated and adsorbed (measured in the MLVs fractions after MLVs destruction),  $m_E$  is the mass of rutin or naringenin encapsulated in MLVs,  $m_F$  is the mass of free rutin or naringenin.

Encapsulation efficiency is defined by:

$$\%_E = \frac{m_E}{m_F + m_{E+A}} \times 100 = \frac{m_{E+A} - m_A}{m_F + m_{E+A}} \times 100 \quad (4)$$

One can express  $\%_E$  as a function of  $\%_A$  and  $\%_{E+A}$  as shown below.

Using Eq. (3) in Eq. (4) gives:

$$\%_E = \%_{E+A} - \frac{m_A}{m_F + m_{E+A}} \times 100 \quad (5)$$

Eq. (2) and Eq. (3) give:

$$\frac{m_A}{m_F + m_{E+A}} = \frac{\%_A}{100 - \%_A} \times \frac{m_F}{m_F + m_{E+A}} = \frac{\%_A}{100 - \%_A} \left(1 - \frac{\%_{E+A}}{100}\right) \quad (6)$$

Eventually, injecting Eq. (6) into Eq. (5) leads to the wanted expression:

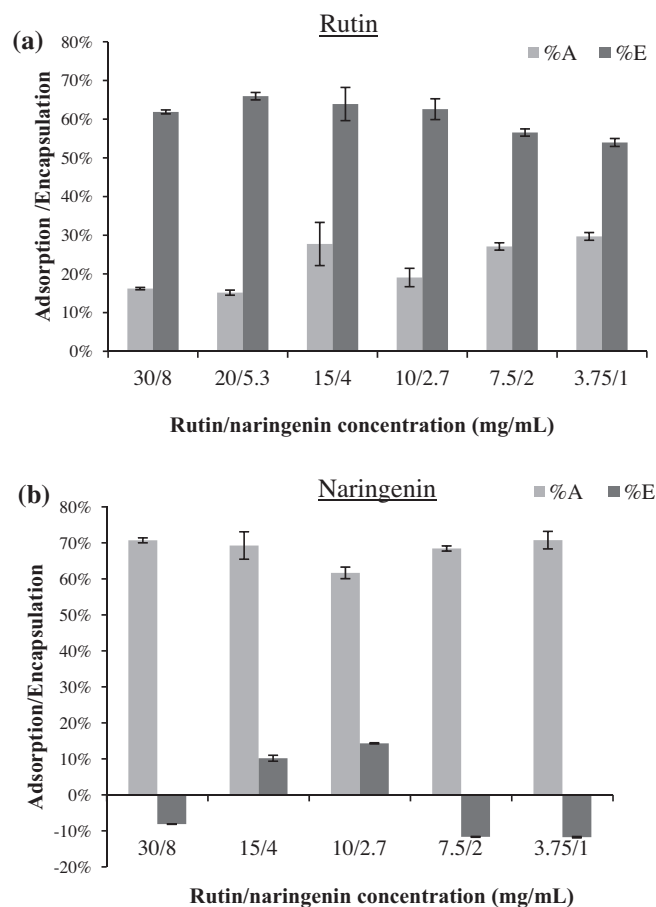
$$\%_E = \frac{\%_{E+A} - \%_A}{100 - \%_A} \times 100. \quad (7)$$

As  $\%_A$  and  $\%_{E+A}$  can be measured separately (see material and methods, Section 2.5), one can separately calculate the percentage of flavonoid encapsulated into MLVs (given by Eq. (7)) and adsorbed onto MLVs (given by Eq. (2)).

### 3.3.2. Influence of flavonoid concentration on the encapsulation yield

A 55/45 (w%/w%) ratio (E930/flavonoid-GPG) was chosen for MLVs composition since this lipid/active ratio led usually to the highest encapsulation yield for MLVs composed of phosphatidylcholine (Olea & Faure, 2003; Faure, Meyre, Trépout, Lambert, & Lebraud, 2009). Rutin and naringenin were encapsulated altogether, keeping a constant weight ratio between both molecules of 3.75. This ratio was chosen because 30 mg of rutin/mL and 8 mg of naringenin/mL are the limits of solubility in GPG in mild conditions (i.e. simple agitation at 40 °C without any ultrasounds, see Section 2). Rutin concentration in GPG was varied from 30 to 3.75 mg/mL, and naringenin then from 8 to 1 mg/mL. The encapsulation efficiency was deduced from Eq. (7) after measuring  $\%_{E+A}$  and  $\%_A$ , from Fig. 2. A high rutin encapsulation efficiency was measured for all tested concentrations. The best encapsulation yield,  $\%_{E_{\text{rutin}}} = 66.0 \pm 3.3\%$ , was obtained for a solution containing both rutin and naringenin concentrated at 20 mg/mL of GPG and 5.3 mg/mL of GPG, respectively. The worse rutin encapsulation yield,  $\%_{E_{\text{rutin}}} = 54.0 \pm 5.7\%$ , was obtained for the smallest rutin and naringenin tested concentrations: 3.75 and 1 mg/mL, respectively (Fig. 2a). Naringenin was mostly adsorbed in comparison with rutin. A percentage of naringenin adsorption larger than  $61.7 \pm 2.1\%$  was indeed measured for all experiments except for the two intermediary concentrations where c.a. 12% was encapsulated (Fig. 2b).

Using the same lipid/GPG weight ratio (55/45 (w%/w%)), the encapsulation efficiencies were measured for systems containing fixed concentration of naringenin (8 mg naringenin/mL of GPG) and varying concentrations of rutin (from 30 to 3.75 mg rutin/mL of GPG). As previously reported, rutin showed high and rather constant encapsulation efficiency, c.a. 60%, for all the tested concentrations (see Supplemental information SI4). Maximum encapsulation yield was obtained for the weakest rutin concentration:



**Fig. 2.** Encapsulation ( $\%_E$ ) and adsorption ( $\%_A$ ) percentages of (a) rutin and (b) naringenin in function of flavonoids concentration in GPG. Composition of MLVs: 55/45 (w%/w%) (lipid/flavonoids-GPG). Rutin is mainly encapsulated while naringenin is mainly adsorbed whatever concentration of the flavonoid mix.

$65.4 \pm 3.0\%$ . Naringenin was not encapsulated in most of the cases except for one of the intermediaries' concentration where the encapsulation yield was much weaker than rutin: c.a. 12%. Here again the adsorption of naringenin was predominant since  $\%_A$  reached almost 70%. Similar results were obtained when naringenin (8 mg/mL) alone was encapsulated in MLVs: c.a. 13% were encapsulated vs. 59% adsorbed.

In summary, c.a. 80% of both molecules were immobilized in MLVs but rutin was mainly encapsulated whereas naringenin was mainly adsorbed on MLV surfaces. This difference could be explained by the smaller molar weight of naringenin ( $M_w = 272$  g/mol) compared to rutin ( $M_w = 610$  g/mol). Naringenin being smaller than rutin may more easily leak from MLVs. Furthermore, molecules configuration may influence their affinity with phospholipidic membranes as assumed by Van Dijk et al. They showed by fluorescence quenching that the glucosylation of naringenin and eriodictyol (a flavanone as naringenin) results in a higher affinity for the vesicle membrane compared to the corresponding aglycons. Glycosylation of flavonoids would favour a more planar configuration and then an easier intercalation in vesicle membrane (Van Dijk et al., 2000). Eventually, Pawlikowska et al. (Pawlikowska-Pawlega et al., 2013) concluded from FTIR, EPR and NMR analyses that small flavonoids such as apigenin are preferentially located in the upper part of the phosphatidylcholine membrane interacting with headgroups through hydrogen bonds. All these reasons could explain the difference in naringenin and rutin behaviours.

### 3.3.3. Influence of lamellar composition on rutin encapsulation yield

As rutin was successfully encapsulated, MLVs composition was optimised with this flavonoid alone. In order to optimise the amount of encapsulated rutin, the E930/rutin-GPG ratio was changed, keeping constant rutin concentration (30 mg/mL of GPG). Previous studies (PrévotEAU & Faure, 2012) showed that the maximal encapsulation efficiency in onion-type MLVs is reached when the lamellar phase is at maximal swelling, i.e. just before the diphasic composition when the rutin-loaded lamellar phase coexists with the rutin-GPG phase. Rutin-GPG is then in excess. Several lipid/rutin-GPG compositions were then studied from 55/45 to 15/85 (w/w%) (Fig. 3a). The rutin encapsulation yield ( $%E_{\text{rutin}}$ ) first increases, from  $53.7 \pm 2.0$  to  $62.4 \pm 0.6\%$ , with the rutin-GPG weight percentage ( $\%_{\text{rutin}}$ ), and then linearly decreases for rutin-GPG percentage higher than 63 w%.

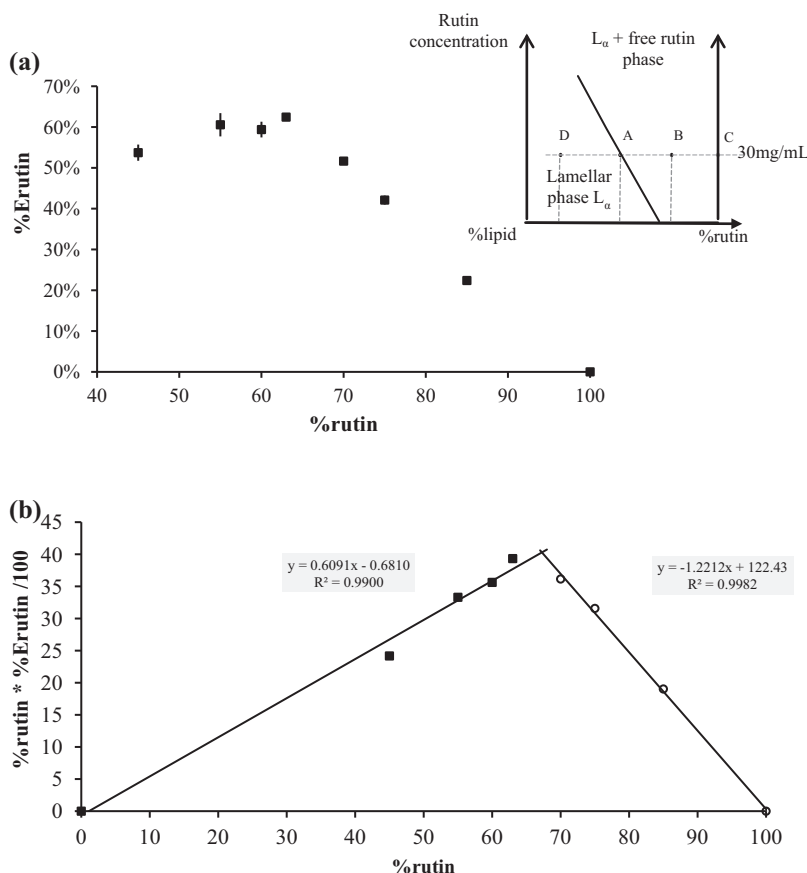
These data can be modelled assuming that increasing the rutin-GPG proportion in the lamellar phase led to the passage from a monophasic lamellar phase (point D in the inset of Fig. 3a) to a diphasic domain where a fraction of rutin-GPG solution forms an excess phase (point B in the inset of Fig. 3a). With these assumptions, plotting  $\%_{\text{rutin}} * \%E_{\text{rutin}}$  vs.  $\%_{\text{rutin}}$  should give two straight lines with their intercept being the composition of the swollen lamellar phase, i.e. the boundary between both domains (point A in the inset of Fig. 3a). The slope of the increasing line gives the encapsulation yield while that of the decreasing line allows the determination of the maximum swelling composition (see additional material, SI5). Fig. 3b displays the corresponding plots.

Using the mathematical model, the encapsulation yield is found to be 61 % and the optimal composition is 33/67 (w/w%) of lipid/

rutin-GPG solution. This optimum ratio is different from the 55/45 (w/w%) usually found in phosphatidylcholine lamellar phase (Olea & Faure, 2003; Faure et al., 2009; PrévotEAU & Faure, 2012). This difference is likely to be due to the nature of the lamellar hydrating solution; GPG instead of water.

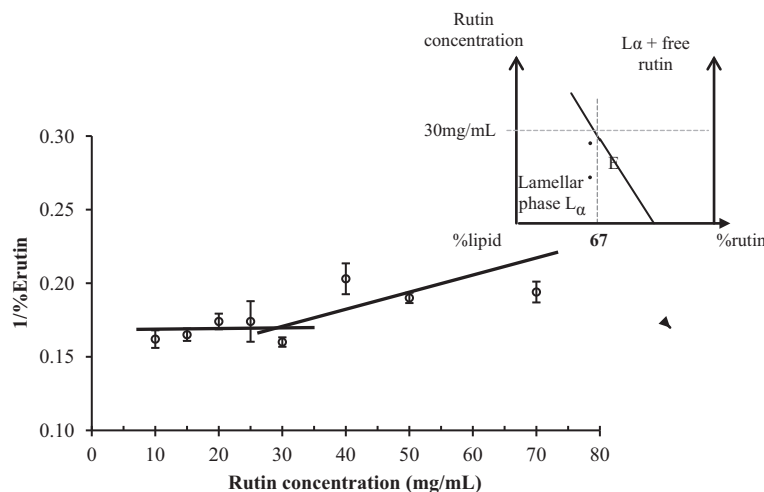
### 3.3.4. Optimisation of rutin concentration

The lipid/rutin-GPG proportion was fixed to 33/67 (w/w%), and the rutin concentration in GPG was increased. If our prediction on the phase diagram was correct, plotting the reverse of  $%E_{\text{rutin}}$  as a function of the rutin concentration in GPG should give two separate behaviours: a constant value for the low concentrations corresponding to the monophasic lamellar domain and a straight line in the biphasic domain where rutin-GPG solution is in excess (see inset Fig. 4 point E, and additional material SI6). Results shown in Fig. 4 are in accordance with these predictions. The optimal rutin concentration was indeed 30 mg rutin/mL ( $49.1 \mu\text{mol/mL}$ ) as shown in the previous section:  $%E_{\text{rutin}}$  was found to be  $62.5 \pm 2.2\%$ , i.e.  $16.54 \mu\text{mol}$  of rutin per gram of MLVs. This value is higher than that reported by Park et al. who encapsulated rutin in ceramide liposomes with an optimal encapsulation efficiency of 58 % (Park, Lee, Kim, & Yu, 2013). Goniotaki et al. measured that  $71 \pm 10\%$  was immobilized in liposomes. However, Goniotaki et al. did not distinguish adsorption from encapsulation (Goniotaki, Hatziantoniou, Dimas, Wagner, & Demetzos, 2004). Doing so, our optimal  $\%E + A_{\text{rutin}}$  value is  $66.9 \pm 1.3\%$  corresponding to  $%E_{\text{rutin}}$   $62.5 \pm 2.2\%$ , which is comparable to that from M. Goniotaki et al. taking into consideration their standard deviation.

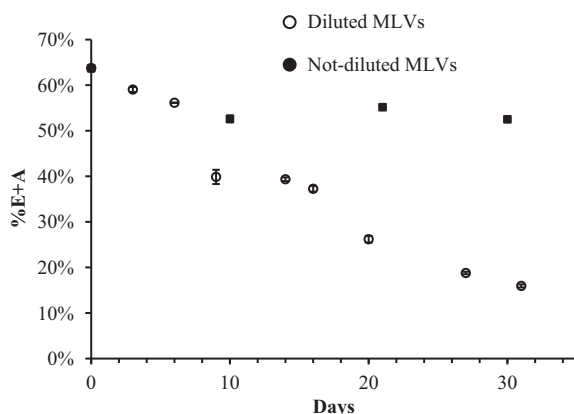


**Fig. 3.** (a) Encapsulation percentage of rutin ( $%E_{\text{rutin}}$ ) in function of rutin-GPG weight proportion ( $\%_{\text{rutin}}$ ) in MLVs composition. Rutin concentration was fixed at 30 mg/mL of GPG. (Inset) – Schematic representation of the phase diagram of lipid/rutin-GPG system. (b) Determination of the optimal rutin-GPG weight proportion using the model described in SI5. The optimal MLVs composition for rutin encapsulation is 33/67 (w/w%) of lipid/rutin-GPG solution with an encapsulation yield of 61%.





**Fig. 4.** Determination of the optimal rutin concentration using the model described in [S16](#) and plotting the reverse of  $\%E_{\text{rutin}}$  as a function of the rutin concentration (mg/mL of GPG) for a 33/67 (w/w%) (lipid/rutin-GPG) MLVs composition. (Inset) Schematic representation of the phase diagram of lipid/rutin-GPG system. The constant value for the low rutin concentrations corresponds to the monophasic lamellar domain and the straight line to the biphasic domain where rutin-GPG solution is in excess.



**Fig. 5.** Kinetics of rutin release from MLVs for two different storage processes at room temperature: when diluted in water (25 mg/mL), and when stored in their compact state. Dilution in the latter case was performed 3 h before measurement. 16% was still encapsulated and adsorbed after 31 days of dispersion while release was negligible when MLVs were stored in their compact state.

### 3.4. Kinetic release of rutin

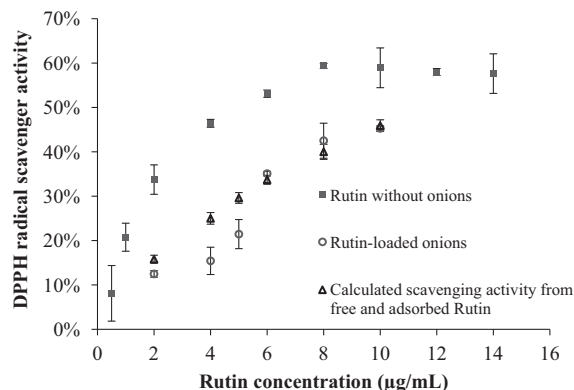
We have demonstrated in previous sections the ability of MLVs to encapsulate a large quantity of rutin. It was then important to evaluate the permeability of these capsules, in other words, the kinetics of rutin leakage from the multilamellar vesicles composed of 33 w% lipid and 67 w% GPG containing 25 mg rutin/mL, kept at room temperature during 1 month. Above 25 mg rutin/mL of GPG, non-encapsulated rutin precipitated in water after few days. All dispersions were dispersed for 3 h the first day and shaken again for few seconds before fractionation the day of analysis. [Fig. 5](#) indicates that rutin gradually leaked from MLVs. This leakage can be explained by the conditioning conditions (room temperature) and by the instability of onion-type MLVs when dispersed in water: onions are known to be thermodynamically unstable and to return to lamellar structure when dispersed, in c.a. 7 weeks ([Olea & Faure, 2003](#)), which is comparable to liposomes stability ([Goniotaki et al., 2004](#)). This was evidenced by optical microscopy. Only onion-type multilamellar vesicles were observed the first day, whereas unilamellar vesicles appeared after 25 days. After 31 days,  $16.0 \pm 0.3\%$  of rutin was still encapsulated. An interesting point is the instability of free rutin. After 9 days, a high percentage of quer-

cetin was observed by HPLC on fractions containing free rutin, showing that rutin lost its sugar groups. Quercetin formation was much less pronounced in MLVs fractions (after their destruction), indicating that only the adsorbed rutin molecules were degraded (See additional information, [S17](#)). This observation demonstrates the ability of MLVs to protect rutin and preserve its integrity.

When onion-type MLVs were stored without being diluted/dispersed in water, almost no rutin release was measured (less than 10% in 31 days). This was expected since after mixing lipid with rutin-GPG solution, the resulting onions are in close compact without any external liquid phase; this drastically limits molecules release.

### 3.5. Antioxidant activity: DPPH assay

The ability of rutin to reduce DPPH radicals was determined by UV absorbance at 700 nm (see Section 2). [Fig. 6](#) shows the DPPH radical scavenger activity as a function of the rutin concentration for rutin-loaded MLVs and for rutin solution. Without MLVs (full squares), DPPH radical scavenger activity stabilized around 60% for rutin concentrations higher than  $8 \mu\text{g/mL}$ . When assays were realised on the optimised rutin-loaded MLVs (empty circles), a diminution of DPPH radical scavenger activity was observed at



**Fig. 6.** DPPH radical scavenger activity percentage in function of rutin concentration. The theoretical activity is calculated assuming that only free and adsorbed rutin molecules are responsible for the scavenging activity. This is confirmed since calculated activities match activities measured on rutin-loaded MLVs.

equivalent rutin concentration, showing the protection of encapsulated rutin.

Knowing that  $62.5 \pm 2.2\%$  of rutin was encapsulated (see previous section), we calculated from free rutin radical scavenger activity the theoretical activity of MLVs, assuming that only free and adsorbed rutin was responsible for their scavenging activity. Fig. 6 shows that for almost all assays, the theoretical radical scavenger activity (empty triangles) corresponded with the measured data. Only two measurements gave weaker data than those expected when the rutin concentration was 4 and 5  $\mu\text{g/mL}$ . Firstly, this confirms the validity of our models to differentiate adsorption from encapsulation, and secondly, this evidences that anti-oxidant activity was thus provided by adsorbed and free rutin, showing that adsorbed rutin molecules are actives contrarily to encapsulated ones.

#### 4. Conclusions

The immobilization of rutin and naringenin was successfully performed in phosphatidylcholine-based MLVs; c.a. 80% was either encapsulated or adsorbed on MLVs surface. A mathematic model was developed to allow the distinction between encapsulated and adsorbed molecules. Naringenin was mainly adsorbed on MLVs surface (>60%), whereas rutin was mainly encapsulated (>60%).

A maximum of 16.5  $\mu\text{mol}$  of rutin was encapsulated per gram of MLVs, when composed of 33 w% of E930 and 67 w% of rutin-GPG (30 mg/mL of GPG), corresponding to an encapsulation yield of 62.5%. This value is higher or comparable to those published on the encapsulation of rutin in liposomes.

Concerning leakage,  $16.0\% \pm 0.3$  of rutin was still encapsulated in onion-type MLVs dispersion after 31 days whereas no leakage was measured when MLVs were kept in their concentrated form within a month. Moreover, MLVs were shown to protect rutin from degradation in quercetin. Eventually, the DPPH test revealed that anti-oxidant activity was provided by free and adsorbed rutin. The next step of the study will be the application of this encapsulation system on natural antimicrobial and antioxidant extract for cosmetics applications.

#### Acknowledgements

The authors are grateful to SO.F.I.A. Cosmétiques and Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) for financial support of this project. The authors wish to thank FEDER and PACA area for financial support. This project was supported by the University of Nice-Sophia Antipolis the University of Bordeaux and the CNRS.

#### Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.005>.

#### References

- Akhtar, M., Murray, B. S., Afeisume, E. I., & Khew, S. H. (2014). Encapsulation of flavonoid in multiple emulsion using spinning disc reactor technology. *Food Hydrocolloids*, 34, 62–67.
- Almeida, J. S., Lima, F., Ros, S. D., Bulhões, L. O. S., de Carvalho, L. M., & Beck, R. C. R. (2010). Nanostructured systems containing rutin: In vitro antioxidant activity and photostability studies. *Nanoscale Research Letters*, 5(10), 1603–1610.
- Charrois, G. J. R., & Allen, T. M. (2003). Rate of biodistribution of STEALTH liposomes to tumor and skin: Influence of liposome diameter and implications for toxicity and therapeutic activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1609(1), 102–108.
- Chen, H.-Y., Lin, Y.-C., & Hsieh, C.-L. (2007). Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. *Food Chemistry*, 104(4), 1418–1424.
- Cheng, N., Wang, Y., Gao, H., Yuan, J., Feng, F., Cao, W., et al. (2013). Protective effect of extract of *Crataegus pinnatifida* pollen on DNA damage response to oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 709–714.
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38(2), 99–107.
- Dhanikula, A. B., Lafleur, M., & Leroux, J.-C. (2006). Characterization and in vitro evaluation of spherulites as sequestering vesicles with potential application in drug detoxification. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1758(11), 1787–1796.
- Diat, O., & Roux, D. (1993). Preparation of monodisperse multilayer vesicles of controlled size and high encapsulation ratio. *Journal de Physique II*, 3(1), 9–14.
- Faure, C., Meyre, M.-E., Trépout, S., Lambert, O., & Lebraud, E. (2009). Magnetic multilamellar liposomes produced by *in situ* synthesis of iron oxide nanoparticles: « Magnetonions ». *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(25), 8552–8559.
- Fernandez, X., Merck, F., & Kerdudo, A. (2012). Conservateurs pour cosmétiques – Antioxydants et Anti-UV. *Techniques de l'Ingénieur*.
- Goniouaki, M., Hatziantoniou, S., Dimas, K., Wagner, M., & Demetzos, C. (2004). Encapsulation of naturally occurring flavonoids into liposomes: Physicochemical properties and biological activity against human cancer cell lines. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56(10), 1217–1224.
- Hädrögä, D. I., Hädrögä, N. G., Bandur, G. N., & Isengard, H.-D. (2012). Water content of flavonoid/cyclodextrin nanoparticles: Relationship with the structural descriptors of biologically active compounds. *Food Chemistry*, 132(4), 1651–1659.
- Iacopini, P., Baldi, M., Storch, P., & Sebastiani, L. (2008). Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(8), 589–598.
- Jantrawut, P., Assifaoui, A., & Chambin, O. (2013). Influence of low methoxyl pectin gel textures and in vitro release of rutin from calcium pectinate beads. *Carbohydrate Polymers*, 97(2), 335–342.
- Kabara, J. J., & Orth, D. S. (1997). Preservative-free and self-preserving cosmetic and drug products: The future. In Kabara, & D.S. Orth (Eds.), *Preservative-free and self-preserving cosmetics and drugs: Principles and practices* (pp. 243–261). New York: Marcel Dekker.
- Konecni, K., Low, N. H., & Nickerson, M. T. (2012). Chitosan–tripolyphosphate submicron particles as the carrier of entrapped rutin. *Food Chemistry*, 134(4), 1775–1779.
- Lauro, M. R., De, S. F., Sansone, F., Iannelli, P., & Aquino, R. P. (2007). Preparations and release characteristics of naringin and naringenin gastro-resistant microparticles by spray-drying. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 17(2), 119–124.
- Lauro, M. R., Maggi, L., Conte, U., De, S. F., & Aquino, R. P. (2005). Rutin and quercetin gastro-resistant microparticles obtained by spray-drying technique. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 15(5), 363–369.
- Maherani, B., Arab-Tehrany, E., Kheirloomoom, A., Geny, D., & Linder, M. (2013). Calcein release behavior from liposomal bilayer: influence of physicochemical/mechanical/structural properties of lipids. *Biochimie*, 95(11), 2018–2033.
- Manjunath, M., Lavanya, G., Sivajyothi, R., & Reddy, O. V. S. (2011). Antioxidant and radical scavenging activity of Actinopterygii radiata. *Asian Journal of Experimental Sciences*, 25(1), 73–80.
- McClements, D. J. (2010). Design of nano-laminated coatings to control bioavailability of lipophilic food components. *Journal of Food Science*, 75(1), R30–R42.
- Mignet, N. (2000). The spherulitesTM: A promising carrier for oligonucleotide delivery. *Nucleic Acids Research*, 28(16), 3134–3142.
- Müller, R. H., Petersen, R. D., Hommoss, A., & Pardeike, J. (2007). Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(6), 522–530.
- Myers, R., Fuller, E., & Yang, W. (2013). Identification of native catechin fatty acid esters in green tea (*Camellia sinensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Olea, D., & Faure, C. (2003). Quantitative study of the encapsulation of glucose oxidase into multilamellar vesicles and its effect on enzyme activity. *The Journal of Chemical Physics*, 119(12), 6111–6118.
- Orhan, D. D., Özçelik, B., Özgen, S., & Ergun, F. (2010). Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiological Research*, 165(6), 496–504.
- Park, S. N., Lee, M. H., Kim, S. J., & Yu, E. R. (2013). Preparation of quercetin and rutin-loaded ceramide liposomes and drug-releasing effect in liposome-in-hydrogel complex system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 435(3), 361–366.
- Pawlikowska-Pawłęga, B., Misiak, L. E., Zarzyka, B., Paduch, R., Gawron, A., & Gruszecki, W. I. (2013). FTIR, <sup>1</sup>H NMR and EPR spectroscopy studies on the interaction of flavone apigenin with dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1828(2), 518–527.
- Pelzer, L. E., Guardia, T., Juarez, A. O., & Guerreiro, E. (1998). Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. *Il Farmaco*, 53(6), 421–424. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-827X\(98\)00046-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-827X(98)00046-9).
- PrévotEAU, A., & Faure, C. (2012). Effect of onion-type multilamellar liposomes on Trametes versicolor laccase activity and stability. *Biochimie*, 94(1), 59–65.

- Roux, D., Degert, C., & Laversanne, R. (1996, décembre 27). Encapsulation De Composes a Usage Alimentaire Par Des Tensioactifs.
- Rovito, H. A., & Oblong, J. e. (2013). Nicotinamide preferentially protects glycolysis in dermal fibroblasts under oxidative stress conditions. *British Journal of Dermatology*, 169, 15–24.
- Sansone, F., Picerno, P., Mencherini, T., Villecco, F., D'Ursi, A. M., Aquino, R. P., et al. (2011). Flavonoid microparticles by spray-drying: Influence of enhancers of the dissolution rate on properties and stability. *Journal of Food Engineering*, 103(2), 188–196.
- Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113, 1202–1205.
- Takahashi, M., Uechi, S., Takara, K., Asikin, Y., & Wada, K. (2009). Evaluation of an oral carrier system in rats: Bioavailability and antioxidant properties of liposome-encapsulated curcumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19), 9141–9146.
- Van Dijk, C., Driessen, A. J., & Recourt, K. (2000). The uncoupling efficiency and affinity of flavonoids for vesicles. *Biochemical Pharmacology*, 60(11), 1593–1600.
- Yen, W.-J., Chyau, C.-C., Lee, C.-P., Chu, H.-L., Chang, L.-W., & Duh, P.-D. (2013). Cytoprotective effect of white tea against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in vitro. *Food Chemistry*, 141(4), 4107–4114.

# Supplemental information

## **Encapsulation of Rutin and Naringenin in multilamellar vesicles for an optimized antioxidant and preservative activity.**

*Audrey Kerdudo<sup>1,2</sup>, Alexandre Dingas<sup>1</sup>, Xavier Fernandez<sup>2</sup>, Chrystel Faure<sup>3\*</sup>*

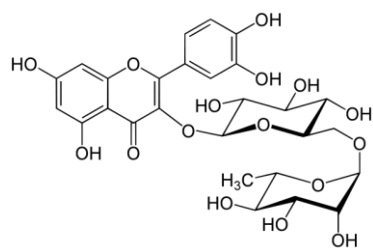
<sup>1</sup> SO.F.I.A. Cosmétiques, 1ère Avenue, 1ère Rue, 06514 Carros, France

<sup>2</sup> Université Nice Sophia Antipolis, ICN, UMR 7272, Parc Valrose, 06108 Nice CEDEX 2, France

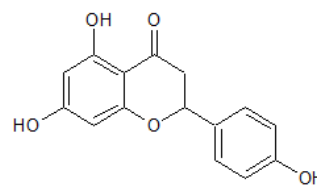
<sup>3</sup> Laboratoire de Chimie et Biologie des membranes et nano-objets, Univ. Bordeaux, CBMN, UMR 5248, Allée Geoffroy St Hilaire, F-33600 Pessac, France

## SI1: CHEMICAL STRUCTURES OF RUTIN AND NARINGENIN

### Chemical structures of rutin and naringenin

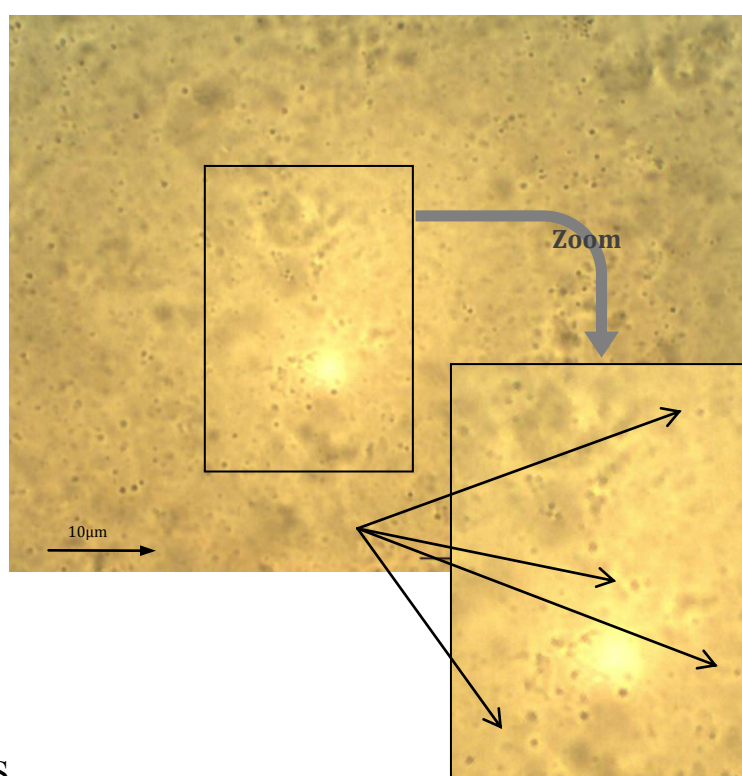


Rutin



Naringenin

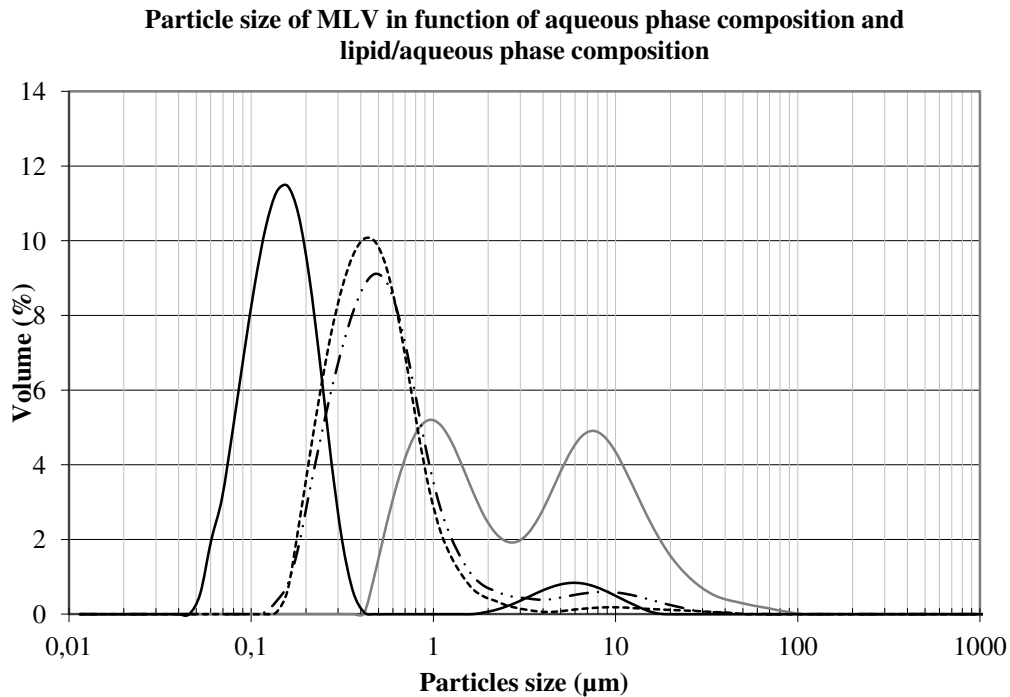
## SI2: OPTICAL MICROSCOPY OBSERVATION OF MULTIAMELLAR



VESICLES

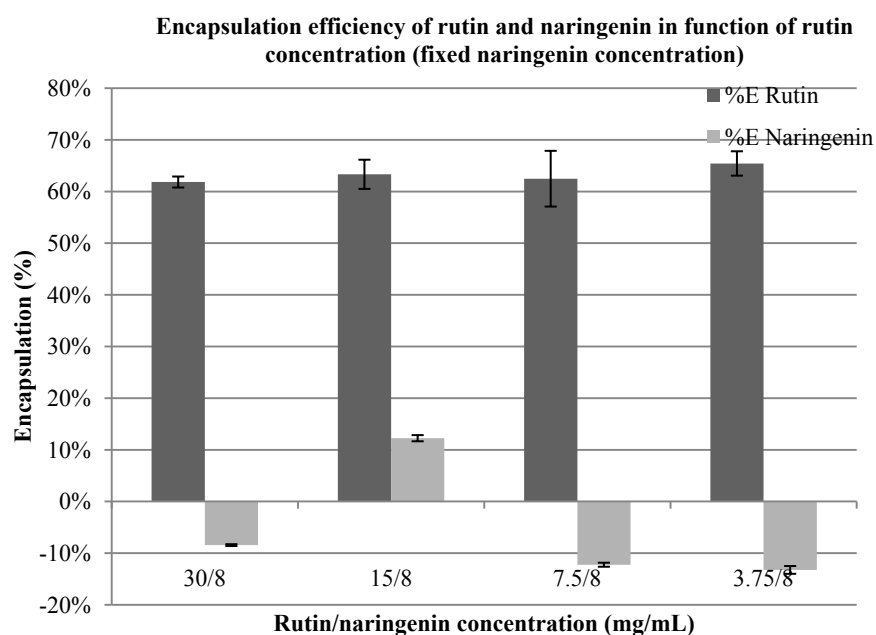
**Optical microscopy observation (X100) of multilamellar vesicles (black dots) composed of 55wt% of lipids and 45wt% of GPG phase. Concentrations in GPG phase (60:40, v/v) were 30 mg of rutin/mL and 8 mg of naringenin/mL.**

## SI3: SIZE DISTRIBUTION OF MULTIAMELLAR VESICLES



**Size distribution of MLVs containing: water (gray curve), GPG (dark gray dotted curve), 30 mg rutin/mL of GPG and 8 mg naringenin/mL of GPG (dark gray dash dotted curve), 25 mg of rutin/mL of GPG (black curve). All vesicles were composed of 55 wt% of E930 except for the rutin-containing ones (33 wt% of lipid).**

SI4: ENCAPSULATION YEILD OF RUTIN AND NARINGENIN IN FUNCTION OF RUTIN CONCENTRATION WHEN NARINGENIN CONCENTRATION WAS SET TO 8MG/ML FOR A 55/45 WT% LIPID TO GPG WEIGHT FRACTION

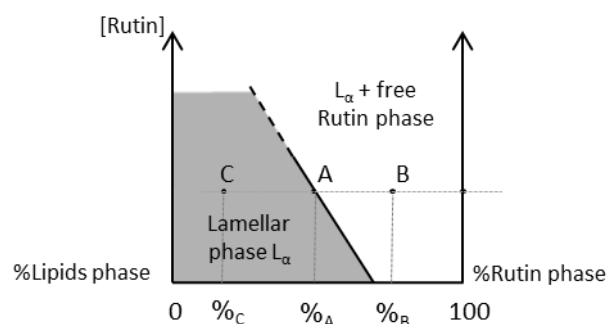


**Encapsulation yield of rutin and naringenin in function of rutin concentration when naringenin concentration was set at 8 mg/mL for a 55/45 wt% lipid to GPG weight fraction.**

Rutin showed high encapsulation yield whatever the concentration (from  $61.0 \pm 1.0 \%$  to  $65.4 \pm 3.0 \%$ ). No naringenin encapsulation was observed but large adsorption except at 15 mg/mL where  $\%E_{\text{Naringenin}}$  was  $12.3 \pm 3.0 \%$ .

SI5: MODEL TO FIT THE ENCAPSULATION YIELD AS A FUNCTION OF LIPID/RUTIN COMPOSITION

In that section, the rutin concentration in samples is fixed but the sample composition is changed from composition C to composition B.



Composition C corresponds to a sample made of concentrated onions (domain of lamellar phase): a major part of the rutin is encapsulated inside onions and the encapsulation yield will be noted %E<sub>α</sub>. Composition A corresponds to a sample made of concentrated onions with the maximal swelling. Composition B corresponds to a diphasic sample where diluted onions coexist with a GPG phase containing rutin.

One want to model the evolution of the encapsulation yield (%E) as a function of the rutin phase proportion (%rutin phase).

Diphasic domain: Sample B:

The rutin encapsulation yield is defined as:

$$\%E_{rut,B} = \frac{m_{rut,B}^{enc}}{m_{rut,B}^t} \times 100 = \frac{m_{rut,B}^{enc}}{\%B \times m_B^t} \times 100 \quad (A)$$

With  $m_{rut,B}^{enc}$  the mass of encapsulated rutin in a sample of composition B,  $m_{rut,B}^t$  the total mass of rutin phase in a sample of composition B,  $m_B^t$  the total mass of sample B (made of lipid and rutin phase), and %B the percentage of rutin phase in sample B.

Assuming that the amount of rutin in the onion phase is fixed by the lipid-to-rutin ratio found in sample A, on can express the mass of rutin in the onion phase in point B as:

$$m_{rut,On,B} = \frac{m_{lip,B} \times m_{rut,A}}{m_{lip,A}} \quad (B)$$

With  $m_{lip,B}$  and  $m_{lip,A}$  the mass of lipids in sample B and A respectively, and  $m_{rut,A}$  the mass of rutin in sample A.

Equation B can be expressed using the percentage of rutin in samples as follows:

$$m_{rut,On,B} = \frac{(100 - \%B) \times \%A}{(100 - \%A)} \times m_B^t \quad (C)$$



With %A the percentage of rutin phase in sample A.

We also assume that the amount of encapsulated rutin in the onion phase is constant and corresponds to that of sample of composition A. Let us note  $\%E_{rut,on}$  this encapsulation yield.

The encapsulated amount of rutin in B is then defined as:

$$m_{rut,B}^{enc} = \frac{\%E_{rut,on}}{100} \times m_{rut,on,B} \quad (D)$$

Using Eq. C and Eq. B in Eq. A leads to

$$\%E_{rut,B} = \%E_{rut,on} \times \frac{(100 - \%B) \times \%A}{(100 - \%A)} \times \frac{1}{\%B} \quad (E)$$

Eq. E can be expressed as:

$$\%E_{rut,B} \times \%B = \frac{100\%E_{rut,on}\%A}{(100 - \%A)} - \frac{\%E_{rut,on}\%A}{(100 - \%A)} \times \%B \quad (F)$$

Following this model, if we plot  $\%E_{rut} \times \%Rut = f(\%Rut)$  we should obtain, in the diphasic domain, a straight line with a slope  $S_d = \frac{\%E_{rut,on}\%A}{(100 - \%A)}$

#### Monophasic domain: sample C

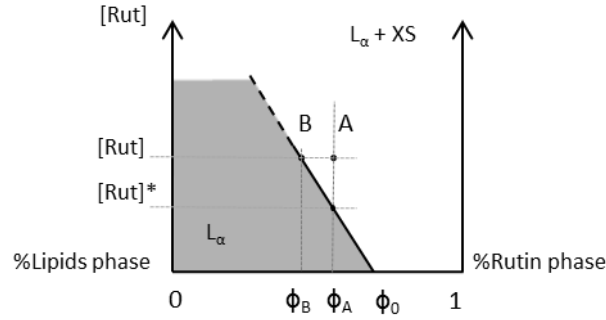
Sample C is the monophasic domain, when concentrated onions are present. According to our assumption, the encapsulation yield is constant and equals to  $\%E_{rut,on}$ . Therefore, if we plot  $\%E_{rut} \times \%Rut = f(\%Rut)$  in the monophasic domain, we should obtain straight line intercepting the graph origin and with a slope  $S_m = \%E_{rut,on}$ .

#### Limit between two domains: sample A

Both lines should intercept in a point that will give the composition of point A, the limit between the monophasic and diphasic domains.

## SI6: MODEL TO FIT THE ENCAPSULATION YIELD AS A FUNCTION OF RUTIN CONCENTRATION

In that section, the lipid-to-rutin composition is fixed but the rutin concentration is changed.



One assumes that the encapsulation yield is constant through the monophasic domain. It will be noted %E<sub>m</sub>

In the diphasic domain, the rutin encapsulation percentage is given by:

$$\%E_d = \frac{n_{L\alpha}^{Rut}}{n_{L\alpha}^{Rut} + n_{XS}^{Rut}} \%E_m = \frac{[Rut]_{L\alpha} \times V_{L\alpha}}{[Rut]_{L\alpha} \times V_{L\alpha} + [Rut]_{XS} \times V_{XS}} \%E_m \quad (1)$$

Where  $n_{L\alpha}^{Rut}$  is the molar number of rutin in lamellar phase,  $n_{XS}^{Rut}$  the molar number of rutin in excess phase,  $[Rut]_{L\alpha}$  the rutin concentration in lamellar phase,  $V_{L\alpha}$  the volume of the lamellar phase,  $[Rut]_{XS}$  the rutin concentration in excess phase,  $V_{XS}$  the volume of the excess phase.

Following the lever rule:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{V_{L\alpha}}{V_t} = \frac{1 - \phi_A}{1 - \phi_B} \\ \frac{V_{XS}}{V_t} = \frac{\phi_A - \phi_B}{1 - \phi_B} \end{array} \right. \quad (2)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{V_{L\alpha}}{V_t} = \frac{1 - \phi_A}{1 - \phi_B} \\ \frac{V_{XS}}{V_t} = \frac{\phi_A - \phi_B}{1 - \phi_B} \end{array} \right. \quad (3)$$

With  $V_t$  the total volume,  $\phi_A$  the volume fraction of rutin in a sample of composition A,  $\phi_B$  the volume fraction of rutin in a sample of composition B.

Using Eq. 2 and 3 in Eq. 1 gives:

$$\%E_d = \frac{[Rut]_{L\alpha} \times \frac{1-\phi_A}{1-\phi_B} \times V_t}{[Rut]_{L\alpha} \times \frac{1-\phi_A}{1-\phi_B} \times V_t + [Rut]_{XS} \times \frac{\phi_A-\phi_B}{1-\phi_B} \times V_t} \%E_m \quad (4)$$

If we define  $K = \frac{[Rut]_{XS}}{[Rut]_{L\alpha}}$

$$\%E_d = \frac{\frac{1-\phi_A}{1-\phi_B}}{\frac{1-\phi_A}{1-\phi_B} + K \times \frac{\phi_A-\phi_B}{1-\phi_B}} \%E_m = \frac{1-\phi_A}{1-\phi_A + K(\phi_A - \phi_B)} \%E_m \quad (5)$$

As expected, if  $\phi_A = \phi_B$ , then  $\%E = \%E_m$

### Relationship between $\phi_A$ and $\phi_B$

We will consider the case where increasing the rutin concentration leads to the transition from the monophasic to the diphasic domain, i.e.  $\phi_B < \phi_A < \phi_0$ .

Assuming a linear boundary between both domains, the slope is defined as:

$$\beta = \frac{[Rut] - [Rut]^*}{\phi_B - \phi_A} \quad (6)$$

Equation 6 can be written:

$$\phi_B - \phi_A = \frac{[Rut] - [Rut]^*}{\beta} = \alpha([Rut] - [Rut]^*) \quad (7)$$

With  $\alpha = \frac{1}{\beta}$

Using Eq.7 in Eq.5:

$$\%E_d = \frac{1-\phi_A}{1-\phi_A + K\alpha([Rut]^* - [Rut])} \%E_m \quad (8)$$

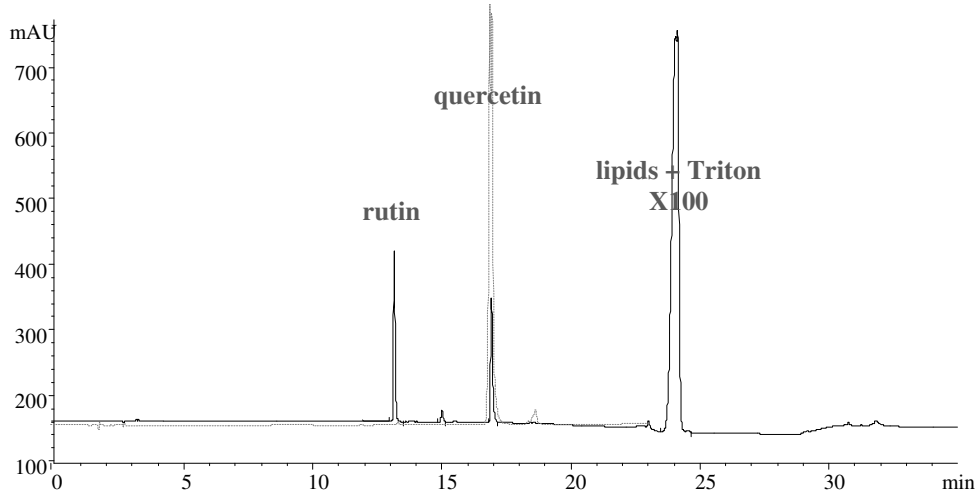
The reverse of  $\%E_d$  will then be written:

$$\frac{1}{\%E_d} = \left( \frac{1}{\%E_m} + \frac{K\alpha[Rut]^*}{(1 - \phi_A)\%E_m} \right) - \frac{K\alpha[Rut]}{(1 - \phi_A)\%E_m} \quad (9)$$

Plotting  $\frac{1}{\%E} = f[Rut]$  should give first a plateau for  $[Rut] \leq [Rut]^*$  (as  $K=0$  in this case) corresponding to  $\frac{1}{\%E_m}$ , and then a straight line (as soon as  $[Rut] > [Rut]^*$ ) with a slope

$$S = -\frac{K\alpha[Rut]}{(1 - \phi_A)\%Lam} \text{ and an Y-intercept of } \frac{1}{\%Lam} - Z[Rut]^*$$

#### SI7: DEGRADATION OF RUTIN INTO QUERCETIN – UV-HPLC ANALYZE



**UV-HPLC chromatograms performed at 258 nm. Dotted line: pure quercetin. Full line: rutin-containing MLVs after triton X100 treatment.**